

**Matea Krpan**

# **Razvoj oftalmičkih nanoemulzija ricinusovog ulja stabiliziranih neionskim surfaktantima**

## **DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Biofarmacija s farmakokinetikom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Jasmine Lovrić.

*Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Jasmini Lovrić na pruženoj prilici, stručnom vodstvu, prenesenom znanju, savjetima te potpori prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.*

*Hvala Biseri Jurišić Dukovski, mag. pharm., asistentici Zavoda za farmaceutsku tehnologiju na strpljenju, savjetima i pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela rada.*

*Hvala kolegici Gloriji Parmać na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela rada.*

*Hvala mojoj obitelji, prijateljima i Draganu na strpljenju i bezuvjetnoj podršci tijekom cijelog studija.*

# SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	Oko kao farmakokinetički problem.....	1
1.1.1.	Potencijal nanoemulzija u oftalmičkoj primjeni .....	4
1.2.	Svojstva i karakterizacija nanoemulzija.....	7
1.2.1.	Veličina kapljica i polidisperznost.....	7
1.2.2.	Stabilnost.....	8
1.2.3.	Optička svojstva.....	9
1.2.4.	Reološka svojstva.....	10
1.2.5.	Elektrokemijska svojstva .....	10
1.3.	Metode izrade nanoemulzija .....	12
1.3.1.	Visokoenergetske metode .....	12
1.3.2.	Niskoenergetske metode .....	14
1.4.	Emulgatori.....	15
1.4.1.	Polisorbat 80 .....	15
1.4.2.	Polisorbat 60 .....	16
1.4.3.	Pluronic F68.....	17
1.4.4.	Cremophor EL.....	19
2.	OBRAZLOŽENJE TEME .....	20
3.	MATERIJALI I METODE .....	22
3.1.	Materijali.....	22
3.2.	Metode .....	22
3.2.1.	Izrada nanoemulzija .....	22
3.2.2.	Određivanje veličine kapljica i indeksa polidisperznosti.....	25
3.2.3.	Određivanje zeta–potencijala kapljica nanoemulzija.....	25

3.2.4. Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija.....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	27
4.1. Izrada nanoemulzija .....	27
4.2. Veličina kapljica .....	27
4.3. Indeks polidisperznosti .....	28
4.4. Zeta potencijal.....	29
4.5. Stabilnost nanoemulzija .....	30
4.5.1. Stabilnost nanoemulzija s Polisorbatom 80 i Polisorbatom 60 kao surfaktantima .....	30
4.5.2. Stabilnost nanoemulzija s Pluronicom F68 kao surfaktantom.....	34
4.5.3. Stabilnost nanoemulzija s Cremophorom EL kao surfaktantom.....	38
5. ZAKLJUČCI.....	41
6. LITERATURA .....	42
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	47

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

# 1. UVOD

## 1.1. Oko kao farmakokinetički problem

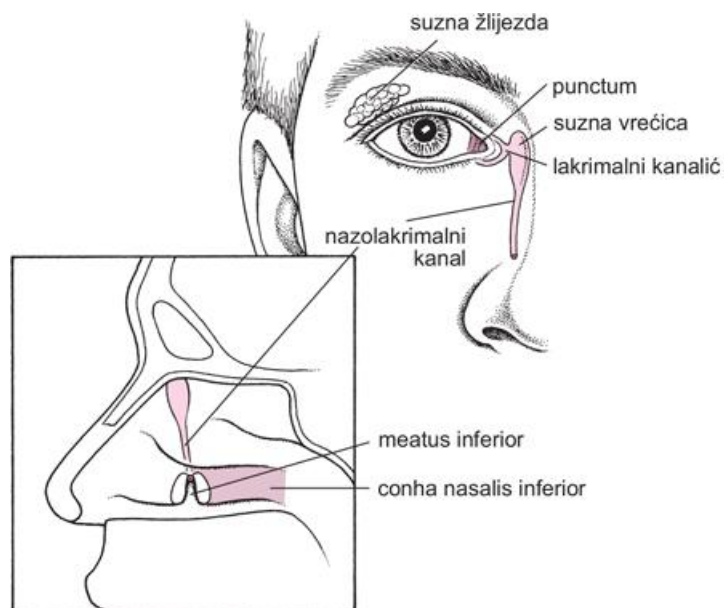
Apsorpcija lijeka kroz prednje dijelove oka određuje njegovu bioraspoloživost nakon topikalne oftalmičke primjene. Barijere prednjeg dijela oka ograničavaju apsorpciju lijeka u oko te je mala bioraspoloživost lijeka jedan od glavnih problema oftalmičke primjene lijekova. Poboljšanje bioraspoloživosti lijeka u oku predstavlja veliki izazov istraživačima, a učinkovita i sigurna primjena oftalmičkih lijekova vrlo je važan zadatak za farmaceutsku industriju. Najčešće upotrebljavan farmaceutski oblik za oftalmičku primjenu su kapi za oko koje su uglavnom u obliku vodenih otopina i suspenzija. Konvencionalne vodene otopine limitirane su mogućnošću uklapanja jedino u vodi topljivih djelatnih tvari te činjenicom da se, unutar 2 minute od primjene, preko 80% pripravka eliminira putem sustava nazolakrimalne drenaže smanjujući apsorpciju lijeka na manje od 1% primijenjene doze (Lallemant i sur., 2011). *In vivo* istraživanja pokazuju da se 90% primijenjene doze lijeka eliminira iz prekornealnog područja u 2 do 4 minute, ovisno o primijenjenom volumenu. Apsorpcija lijeka je velika po primjeni nakon čega slijedi njezino brzo opadanje (Pepić, 2004a).

Nakon lokalne oftalmičke primjene lijek dolazi u kontakt s brojnim preprekama njegovoj apsorpciji što je posljedica vrlo kompleksne anatomije i fiziologije ljudskog oka. Složena sudbina lijeka nakon lokalne primjene posljedica je niza parametara kao što su strukturalna različitost slojeva ocnog tkiva te zbivanja u prekornealnom području i unutrašnjosti oka, ali i karakteristike samog farmaceutskog oblika. Neke od prepreka lokalnoj oftalmičkoj primjeni lijekova su dinamika suzne tekućine, nazolakrimalna drenaža, kratko vrijeme dodira s ocnom površinom, relativna nepermeabilnost rožnice te konjunktivalna i nazalna apsorpcija. Općenito je prihvaćeno da nanotehnologija nudi mogućnost razvoja terapijskih sustava koji osiguravaju uspješno prevladavanje prepreka oftalmičke primjene lijeka (Reimondez - Troitiño i sur., 2015).

Suze su bistra izotonična otopina koju stalno luče suzne žlijezde, a raspoređuju se po oku treptanjem (Pepić, 2004b). Količina i sastav prekornealnog suznog filma određuju normalnu funkciju očne površine osiguravajući joj vlažnost, transparentnost i vanjsku zaštitu. Upravo suzni film pruža prvi otpor prolasku lijeka u tkivo oka zbog toga što se vrlo brzo i često obnavlja. Na taj način smanjuje se udio primijenjene doze koji će biti raspoloživ za farmakološki učinak.

Fiziološki mehanizmi prekornealnog područja oka fizički odstranjuju strane čestice s površine oka, ali jednako učinkovito uklanjaju i primijenjene oftalmičke pripravke. Ti mehanizmi uključuju dinamiku suzne tekućine (tok i isparavanje suza), vezanje lijeka na proteine suzne tekućine i njegovu razgradnju (Pepić, 2004b).

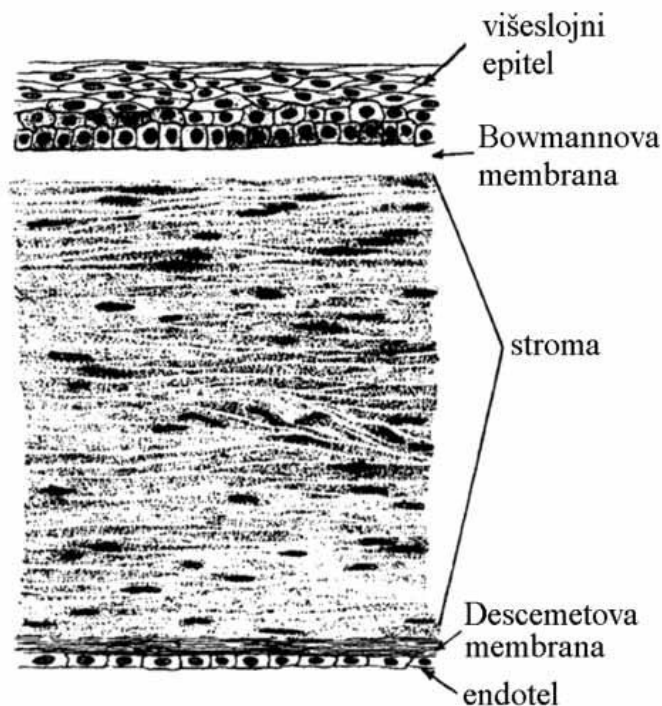
Sustav nazolakrimalne drenaže odvodi suze s površine oka u nosnu šupljinu. Stalni tok suza izlučenih iz suznih žlijezda ispire površinu oka, a zatim se odvodi iz oka kroz dva mala otvora u unutarnjem kutu oka. Kroz te otvore suze prolaze u gornji i donji suzni kanalić koji ih odvođe u suznu vrećicu, zatim iz suzne vrećice u nazolakrimalni kanal i konačno u nosnu šupljinu. To je protektivni aparat oka koji mu kontinuiranim ispiranjem omogućuje održavanje vlažnosti i zaštitu od prašine i drugih iritirajućih čestica.



**Slika 1.** Suzni sustav (preuzeto s [www.msd-prirucnici.placebo.hr](http://www.msd-prirucnici.placebo.hr)).

Zajedno sa suznom tekućinom u nosnu šupljinu odlaze i strane čestice ili primijenjeni pripravak. U slučaju aplikacije preobilnog volumena pripravka dodatno se aktivira refleks suzenja i treptanja. Refleks treptanja potiče nazolakrimalnu drenažu (Pepić, 2004b). Stoga je vrijeme dodira pripravka s očnom površinom relativno kratko iz čega proizlazi i činjenica da je količina lijeka koja dospije različita očna tkiva značajno manja od primijenjene doze. Razlog tomu je i već spomenuta brza i česta obnova suzne tekućine.

Rožnica je konveksni, transparentni, prednji dio vanjskog sloja koji čini jednu šestinu vanjske očne ovojnice. Ona prekriva zjenicu, šarenicu i očnom vodicom ispunjenu prednju očnu sobicu. Prva je biološka barijera oka što ju čini najizloženijom vanjskim uvjetima i stranim tvarima. Tkivo rožnice složeno je u tri osnovna sloja od kojih svaki ima različitu polarnost, s dva tanja sloja, odnosno membrane, između njih. To su, od površine prema unutrašnjosti rožnice: lipofilni epitel, Bowmanova membrana, hidrofilna stroma, Descemetova membrana i lipofilni endotel.



**Slika 2.** Poprečni presjek rožnice (preuzeto iz Pepić, 2004b).

S obzirom da se sastoji i od lipofilnih i hidrofilnih struktura rožnica je selektivna barijera apsorpciji i hidrofilnih i lipofilnih lijekova. Najznačajnija prepreka vanjskim utjecajima, pa tako i prolasku molekula lijekova, je vanjski površinski sloj - epitel rožnice. On se sastoji od 5-6 gusto složenih slojeva stanica. Lipofilni stanični slojevi epitela čine 90% ukupne količine stanica rožnice te se značajno opiru permeaciji topikalno primijenjenih hidrofilnih lijekova. Osim toga, površinske stanice epitela rožnice povezane su dezmosomima i tzv. čvrstim vezama (eng. *tight*

*junctions*). Čvrste veze među stanicama usporavaju paracelularni prolazak molekula iz suznog filma u unutarstanične prostore epitela kao i u ostale, unutarnje slojeve rožnice. Na taj način slojevi epitela formiraju učinkovitu barijeru ne samo za većinu mikroorganizama, nego i za lijekove što čini epitel rožnice glavnim regulatorom apsorpcije primijenjenih oftalmika.

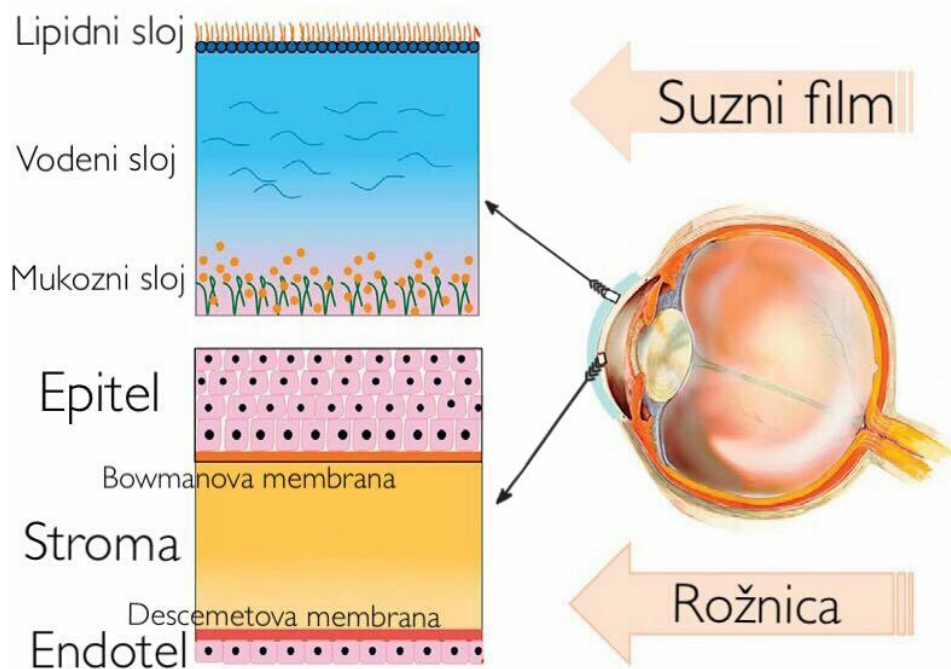
Za učinkovitu apsorpciju kroz kornealnu barijeru lijek bi trebao imati i lipofilne i hidrofilne karakteristike te imati dovoljno malu veličinu molekula (Pepić, 2004b).

### **1.1.1. Potencijal nanoemulzija u oftalmičkoj primjeni**

Lipidni terapijski nanosustavi, u koje se ubrajaju i nanoemulzije, pokazuju potencijal za poboljšanje bioraspoloživosti lijeka u oku te kontroliranog i ciljanog oslobađanja i smanjenja učestalosti nuspojava (Gan i sur., 2013).

Jedan od uzroka postizanja ovih povoljnih učinaka, činjenica je da se nanoemulzije u kontaktu s očnom površinom ponašaju poput umjetnog suznog filma. Suzni se film sastoji od tri sloja: vanjskog lipidnog sloja koji sprječava isparavanje vodenog sloja smještenog ispod njega te mukoznog sloja najbližeg rožnici koji izlučuje hidrofilni gel na površinu hidrofobnog epitela rožnice čime se omogućuje ravnomjerna raspodjela vodenog sloja po površini oka. Vodeni sloj je volumno najzastupljeniji sloj suznog filma. Od velike je važnosti da se rasporedi po cijeloj površini oka, kao i da s nje ne ispari, jer on opskrbljuje stanice epitela rožnice kisikom i održava površinu oka glatkom. Nakon primjene pripravka na površinu oka, kapljice nanoemulzije dolaze u kontakt sa suznim filmom kojem su vrlo slične svojim sastavom. Vodena faza emulzije može povećati vodeni sloj suznog filma i dodatno ovlažiti rožnicu. Raspadanjem uljnih kapljica oslobađa se uklopljena djelatna tvar, a uljna faza se sjedinjuje s prirodnim lipidnim slojem suznog filma te tako sudjeluje u ograničavanju gubitka vodenog sloja isparavanjem (Gan i sur., 2013). Istraživanja su pokazala da emulgatori mogu pojačati mukozni sloj i tako unaprijediti sposobnost ovlaživanja koju prirodno posjeduje suzni film ([www.reviewofoptometry.com](http://www.reviewofoptometry.com)). Ovakvo ponašanje nanoemulzija vrlo je korisno u liječenju sindroma suhog oka (Gan i sur., 2013).

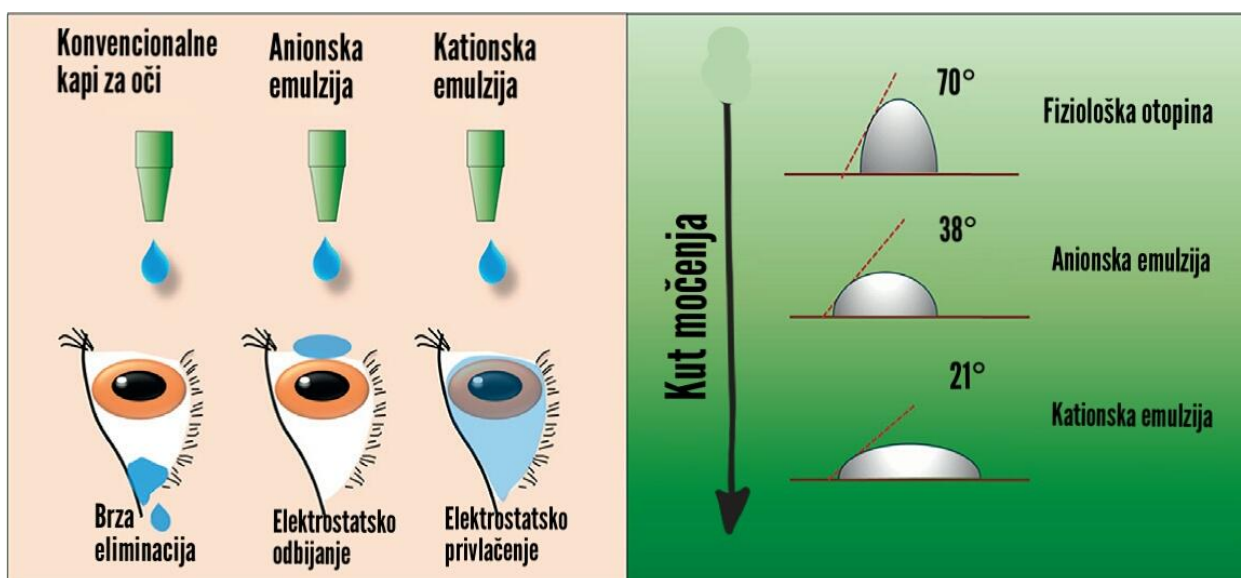




**Slika 3.** Dvije osnovne prepreke topikalnoj primjeni lijeka u oko: suzni film i rožnica  
(preuzeto iz Gan i sur., 2013).

Kratko zadržavanje pripravka na površini oka također je velika prepreka uspješnoj primjeni oftalmika. Nanoemulzije mogu pridonijeti poboljšanju bioraspodjelivosti nakon topikalne primjene oftalmika produžujući vrijeme dodira s očnom površinom i povećavajući transkornealnu ili transkonjunktivalnu apsorpciju lijeka. Lipidne sastavnice nanoemulzija ulaze u interakcije s lipidnim slojem suznog filma što omogućuje duže zadržavanje u konjunktivalnoj vrećici i postupno oslobađanje (ponašanje poput depo lijeka). Osim toga, emulgatori pridonose smanjenju

kontaktnog kut između kapi nanoemulzije i površine rožnice. Zbog smanjenja kuta močenja emulzija ima dobra svojstva širenja po površini oka, a i sposobnost ovlaživanja se poboljšava. Nadalje, kapljice nanoemulzije se mogu modificirati kationskim materijalima kako bi se dobili pozitivno nabijeni nosači lijeka. Pozitivni naboj na površini kapljica pospješuje dulje zadržavanje na površini oka zbog elektrostatskih interakcija s negativno nabijenom površinom oka (Alany i sur, 2006; Gan i sur., 2013; Aoki i sur, 2005).



**Slika 4.** Kationske emulzije poboljšavaju sposobnost vlaženja površine oka. Elektrostatsko privlačenje između kationske nanoemulzije i negativno nabijene površine rožnice povećava sposobnost vlaženja površine oka (lijevo). Smanjeni kut močenja kationske nanoemulzije, u odnosu prema fiziološkoj otopini (desno); (preuzeto iz Gan i sur., 2013).

## 1.2. Svojstva i karakterizacija nanoemulzija

Nanoemulzije su disperzni sustavi, koji se sastoje od dviju tekućina koje se međusobno ne miješaju, a stabilizirani su prikladnim surfaktantom. Prosječni promjer kapljica unutarnje faze manji je od 1000 nm, a najčešće se kreće između 20 i 200 nm (Dhas i sur., 2016; Jaiswal i sur., 2015; Ee i sur., 2008) ili između 10 i 500 nm (Sharma i sur., 2013). Nanoemulzije (U/V) uspješno se primjenjuju u parenteralnoj prehrani, a od nedavno su se počele intenzivno istraživati i kao nosači lijekova odnosno terapijski sustavi za različite puteve primjene, kao što su intravenska, intramuskularna, oralna, rektalna, dermalna i oftalmička (Hofmann i Zimmer, 2016; Đorđević i sur., 2013). Kako bi razjasnili prednosti nanoemulzija u odnosu na klasične oftalmičke pripravke nužno je razmotriti njihova osnovna svojstva i karakteristike.

### 1.2.1. Veličina kapljica i polidisperznost

Osnovna svojstva nanoemulzija su prosječna veličina kapljica i njihova polidisperznost. Za određivanje tih svojstava najčešće se koristi metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti ili fotonska korelacijska spektroskopija, a također se koriste i metode elektronske mikroskopije (García-Celma i sur., 2016).

Veličina kapljica nanoemulzije ključni je faktor u određivanju farmakokinetičkih svojstava uklopljenog lijeka stoga je određivanje tog faktora ključno ispitivanje tijekom razvoja nanoemulzija. Metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti temelji se na činjenici da će kapljice disperzne faze raspršiti svjetlo pod kutem koji je obrnuto proporcionalan njihovoj veličini. Polidisperznost je izraz koji se koristi za opisivanje uniformnosti raspodjele veličina. Kod karakterizacije nanoemulzija to je mjera heterogenosti veličine dispergiranih kapljica. Ta veličina proporcionalna je standardnoj devijaciji funkcije raspodjele veličine čestica – DSD (*eng. droplet size distribution*). Što je veća standardna devijacija, to je veća polidisperznost (García-Celma i sur., 2016). DSD funkcija je obično prikazana dijagramima ili histogramima koji prikazuju raspodjelu veličina i može imati jedan ili više, simetričnih ili asimetričnih pikova.

Najčešće korištene veličine koji opisuju polidisperznost su raspon (*eng. span*), indeks polidisperznosti – PDI (*eng. polydispersity indeks*) i koeficijent varijacije – CV%. Spomenute veličine dobivaju se na sljedeći način:

$$\text{span} = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}}$$

$D_{90}$  – veličina čestica od koje je manje 90% čestica cijelog uzorka

$D_{10}$  – veličina čestica od koje je manje 10% čestica cijelog uzorka

$D_{50}$  – veličina čestica koja odgovara vrijednosti kumulativnog udjela od 50%; ta vrijednost poznata je kao medijan

$$\text{PDI} = \left( \frac{\sigma}{D_{50}} \right)^2$$

$\sigma$  – standardna devijacija

$$\text{CV}\% = \frac{\sigma}{D_{50}} \times 100 = \sqrt{\text{PDI}} \times 100$$

### 1.2.2. Stabilnost

Stabilnost se može definirati kao sposobnost sustava da zadrži svoja svojstva tijekom vremena ili pod utjecajem vanjskih faktora (García-Celma i sur., 2016). Nanoemulzije su termodinamički nestabilne – slobodna energija koloidne disperzije (kapi ulja u vodi) je veća od slobodne energije odvojenih faza (ulje i voda). Međutim, ako se osigura dovoljna energetska barijera između ove dvije faze, nanoemulzije će biti kinetički stabilne (Đorđević i sur., 2013). Osnovno svojstvo koje određuje visoku kinetičku stabilnost nanoemulzija i koje im omogućuje otpornost na procese sedimentacije i vrhnjenja je mala veličina kapljica. Nestabilnost je kod nanoemulzija najčešće posredovana agregacijom kapljica, što uzrokuje rast veličine kapljica i zbog čega se gube sve posebne karakteristike koje ovi sustavi imaju upravo zbog veličine kapljica u nanometarskom području. Osnovni izvor nestabilnosti nanoemulzija je proces Ostwaldovog zrenja zbog kojeg veće kapljice, čija je potencijalna energija veća, privlače manje kapljice i tako još više rastu. Uslijed ovakvog sporog i postupnog povećanja veličine kapljica u konačnici može doći do odvajanja faza nanoemulzije. Postoje i drugi procesi koji mogu uzrokovati promjenu sastava nanoemulzija i time promijeniti njihova svojstva i ometati

funkcionalnost, npr. kemijske promjene ili degradacija sastavnica nanoemulzije. Do takvih promjena dolazi uslijed kontakta s atmosferskim kisikom ili drugim oksidansima, izloženosti sunčevom svjetlu što rezultira fotokemijskim reakcijama ili zraku što može dovesti do degradacije djelovanjem mikroorganizama. Kako bi se spriječile oksidacija i biodegradacija u formulacije se dodaju antioksidansi i konzervansi.

### 1.2.3. Optička svojstva

Veličina kapljica i njihova koncentracija su faktori koji određuju boju i transparentnost – najznačajnija optička svojstva nanoemulzija. Nanoemulzije se vizualno razlikuju od klasičnih emulzija jer njihove kapljice mogu biti znatno manje od valnih duljina svjetlosti vidljivog dijela spektra (Mason i sur, 2006). Transparentnost se može postići ne samo smanjenjem veličine čestica, nego i usklađivanjem indeksa refrakcije dispergirane i kontinuirane faze. Da bi se uskladili indeksi refrakcije mogu se dodati različita suotapala i topljive tvari (García-Celma i sur., 2016).



**Slika 5.** Nanoemulzija (lijevo) – promjer kapljica 35 nm i makroemulzija (desno) – promjer kapljica 1  $\mu\text{m}$  (preuzeto iz Solans i sur., 2005).

#### **1.2.4. Reološka svojstva**

Reologija je znanstvena disciplina koja proučava tečenje materijala i/ili njegove deformacije pri djelovanju neke vanjske sile. Promjene u strukturi i sastavu nanoemulzija rezultiraju mjerljivim promjenama reoloških svojstava što čini reološku karakterizaciju važnim vidom karakterizacije nanoemulzija tijekom njihovog razvoja, ali i kontrole kvalitete gotovih pripravaka (Tadros, 2013). Nanoemulzije pokazuju različita reološka svojstva u rasponu od Newtonovih sustava do viskoelastičnih sustava različite konzistencije (García-Celma i sur., 2016). Reološka svojstva nanoemulzija mogu se regulirati kontrolirajući volumni udio dispergirane faze i veličinu kapljica te dodatkom soli i tvari koji potiču geliranje (primjerice polimeri čijom međusobnom interakcijom ili interakcijom s disperznom fazom nanoemulzije dolazi do nastanka gela).

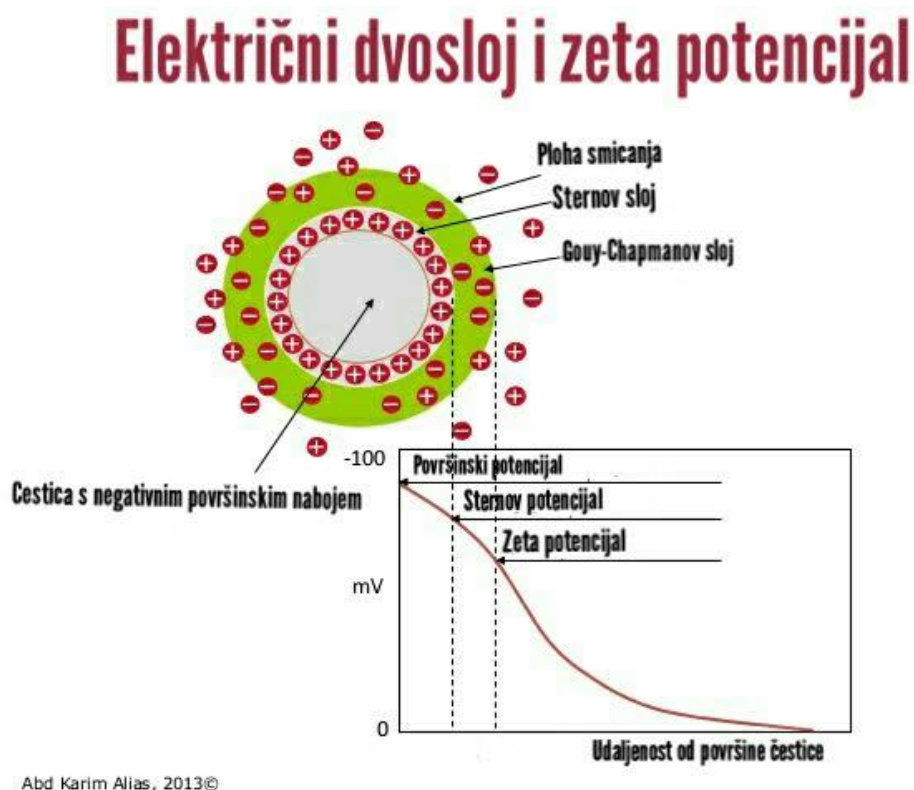
#### **1.2.5. Elektrokemijska svojstva**

Ravnoteža između privlačnih i odbojnih sila koje se pojavljuju među kapljicama nanoemulzije važna je za njihovu stabilnost. Kapljice nanoemulzije mogu biti i nabijene čestice. Taj naboj može potjecati od ionskih surfaktanata, različitih elektrolita, slobodnih masnih kiselina iz korištene uljne faze i sl. Za elektrokemijsku karakterizaciju ovih sustava najčešće koristimo sljedeće veličine: specifična električna provodljivost ( $\kappa$ ) i površinski električni naboj (zeta-potencijal) (García-Celma i sur., 2016).

Specifična električna provodljivost je mjera sposobnosti materijala da provodi električnu struju. Može upotrijebiti za određivanje tipa emulzije. Budući da U/V tip emulzije karakteriziraju relativno visoke vrijednosti specifične provodljivosti dok V/U tip pokazuje vrlo niske vrijednosti, moguće je proučavati procese inverzije faza promatrajući promjene vrijednosti specifične provodljivosti s promjenom temperature ili koncentracije neke od komponenti (García-Celma i sur., 2016).

Surfaktanti koji okružuju kapljice unutarnje faze mogu biti nabijene molekule (ionski surfaktanti) ili molekule koje mogu ionizirati ovisno o okolini (amfoterni surfaktanti). Također, kontinuirana faza može sadržavati elektrolite. Postojeće elektrokemijske teorije opisuju kako se ioni suprotnog naboja u vanjskoj fazi premiještaju u blizinu kapljice kako bi neutralizirale višak naboja koji se nalazi na površini kapljice, tvoreći električni dvosloj (García-Celma i sur., 2016).

Unutrašnji sloj toga dvosloja naziva se Sternov sloj gdje su suprotno nabijeni ioni čvrsto vezani na površinu kapljice, a vanjski sloj električnog dvosloja difuzijski je sloj gdje su ioni slabije vezani na površinu kapljice te je taj sloj pomičan (Gouy-Chapmanov sloj). U difuzijskom sloju postoji imaginarna granica unutar koje je Sternov sloj te dio "vezanih" iona difuzijskog sloja koji u električnom polju putuju prema elektrodi suprotnog naboja zajedno s nabijenom česticom. Oni ioni koji se nalaze izvan zamišljene granice ne gibaju se s česticom. Potencijal na toj granici, odnosno plohi smicanja je zeta-potencijal. Vrijednost zeta-potencijala govori o stabilnosti nanoemulzije, a može se odrediti iz elektroforetske pokretljivosti kapljica. Visoko pozitivan ili visoko negativan zeta-potencijal na površini čestica uzrokovat će njihovo međusobno odbijanje. U odsutnosti steričke stabilizacije kapljica, generalno je prihvaćeno da je potrebna vrijednost zeta-potencijala pozitivnija od +30 mV ili negativnija od -30 mV kako bi disperzija bila stabilna (García-Celma i sur., 2016).



**Slika 6.** Električni dvosloj i zeta potencijal (preuzeto sa [www.slideshare.net/akarim717/emulsion-stability](http://www.slideshare.net/akarim717/emulsion-stability)).

### **1.3. Metode izrade nanoemulzija**

Metode izrade nanoemulzija dijele se s obzirom na količinu energije koju je potrebno dovesti sustavu da bi se one formirale. Ako je potrebna energija dobivena od nekog vanjskog izvora (mehanički uređaji) radi se o visokoenergetskim metodama, dok se kod niskoenergetskih metoda iskorištava energija pohranjena u sustavu.

#### **1.3.1. Visokoenergetske metode**

Visoko energetske metode ovise o mehaničkim uređajima koji stvaraju snažne, razorne sile potrebne za smanjenje veličine kapljica. Najčešće korišteni mehanički uređaji za proizvodnju nanoemulzija su homogenizatori pod visokim tlakom, mikrofluidizatori i ultrasonikatori. Najveća prednost visokoenergetskih metoda je u tome što se pomoću ovih uređaja gotovo bilo koje ulje može podvrgnuti nanoemulzifikaciji. Nedostaci su visoka cijena te osjetljivost lijekova na spomenute razorne sile koje ovi uređaji stvaraju.

Rad mikrofluidizatora temelji se na hidrauličkom sustavu koji dovodi stlačeno hidrauličko ulje do potisne visokotlačne pumpe (Microfluidizer® Processor: Priručnik za uporabu, 2012). Potisna pumpa pojačava hidraulički tlak i pretvara ga u tlak koji djeluje na uzorak koji se obrađuje. Radni tlak koji se na ovaj način postiže može dosegnuti i 2000 Bara. Za vrijeme perioda usisavanja, pumpa mikrofluidizatora vuče uzorak iz ulaznog spremnika u tlačnu komoru preko ulaznog nepovratnog ventila. Zatim slijedi period snažnog potiska za vrijeme kojeg je uzorak izložen konstantnoj razini tlaka. Stlačeni uzorak ulazi u interakcijsku komoru gdje prolazi vrlo uskim mikrokanalima stalnih dimenzija pri čemu dolazi do ubrzanja protoka uzorka do brzine vrlo visokih vrijednosti. Ovdje na uzorak djeluju dvije sile zbog kojih dolazi do željenog rezultata (smanjenja veličine kapljica): sila smicanja koja uzorkuje deformaciju uzorka zbog doticaja sa stijenkama mikrokanalića pri visokoj brzini i sila sudara koja se javlja kada struja uzorka velike brzine djeluje sama na sebe. Nakon izlaska iz interakcijske komore uzorak se dalje procesuiru i prolazi kroz pomoćne module za obradu. Izmjenjivač topline vraća struju uzorka na sobnu temperaturu. Obično se grube emulzije više puta propuštaju kroz mikrofluidizator (ponekad i do 100 ciklusa) dok se ne postigne željena veličina kapljica i indeks polidisperznosti.





**Slika 7.** Mikrofluidizator (preuzeto iz Microfluidizer® Processor: Priručnik za uporabu, 2012).

Sličan je i princip rada visokotlačnog homogenizatora gdje visokotlačna pumpa tjera grubu emulziju kroz vrlo sitne otvore zbog čega se velike kapljice unutarnje faze razbijaju u manje. Kod ultrasonikacije koriste se zvučni valovi visoke frekvencije. U ultrasonikatoru valovi visoke energije stvaraju turbulentnu silu koja razara kapljice (kavitacija) (Gupta i sur., 2016). Visokotlačna homogenizacija i ultrasonikacija se, kao i mikrofluidizacija, ponavljaju do željene veličine kapljica i indeksa polidisperznosti.

### 1.3.2. Niskoenergetske metode

Razvoj niskoenergetskih metoda izrade nanoemulzija posljedica je proučavanja intrinzičnih fizičko-kemijskih svojstava i međudjelovanja ulja, surfaktanata, kosurfaktanata, vodene faze i djelatnih tvari. Dije se na metode spontanog emulgiranja i metode fazne inverzije.

Kod spontanog emulgiranja U/V emulzija nastaje kada se otopina ulja u vodotopljivom organskom otapalu (npr. etanol, aceton) pomiješa s vodom. Polarno organsko otapalo tada difundira u vodenu fazu te nastaje sustav kapljica ulja dispergiranih u vodenoj kontinuiranoj fazi (García-Celma i sur., 2016). Umjesto polarnog organskog otapala u vodenu fazu može difundirati i korišteni, najčešće polioksietilirani, surfaktant.

Za razliku od ostalih, metode fazne inverzije započinju V/U makroemulzijom koja se zatim transformira u U/V nanoemulziju zbog promjena u sastavu ili temperaturi (Gupta i sur., 2016). Najčešće korištena metoda ove vrste je metoda temperature fazne inverzije (eng. *phase inversion temperature*, PIT). Obično se gruba V/U emulzija zagrijava na temperaturu iznad predodređene temperature fazne inverzije (PIT) koja je specifična za danu formulaciju, te se zatim naglo hladi ili razrjeđuje vodenom fazom. Pri temperaturi fazne inverzije dolazi do transformacije smjese iz V/U u U/V emulziju. Ova inverzija moguća je zbog različite topljivosti surfaktanta u uljnoj i vodenoj fazi ovisno o temperaturi.

## 1.4. Emulgatori

Kako bi se omogućila priprava te postigla stabilnost disperzija dviju tekućina koje se ne miješaju neophodna je upotreba emulgatora. Emulgatori su površinski aktivne tvari (surfaktanti) koji smanjuju površinsku napetost na granici faza, odnosno smanjuju sile koje djeluju na granici između dviju faza koje se ne miješaju. Emulgator se smješta na međupovršinu između faza i tvori elastičan film koji ne puca prilikom sudara kapljica. Budući da se molekule emulgatora smještaju na granicu dviju faza i tvore „barijeru“ među fazama on mora biti specifične građe, odnosno mora sadržavati i hidrofilne i lipofilne skupine. Emulgatori se na granici faza svojim hidrofilnim dijelom orijentiraju prema vodenoj fazi, a lipofilnim prema uljnoj fazi.

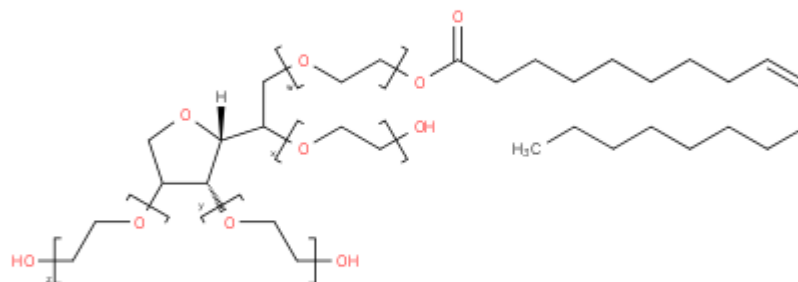
Tip emulzije određuje se prema uporabljenom emulgatoru, jer vrijedi pravilo: faza u kojoj je emulgator topljiv, uvijek je vanjska faza (Bankroftovo pravilo) (Senjković, 2003).

Emulgatori se dijele na topljive (ionski, neionski, amfoterni i kompleksni), netopljive i pseudoemulgatore.

### 1.4.1. Polisorbat 80

Polisorbat 80 ili Tween 80 neionski je emulgator koji pripada skupini parcijalnih estera masnih kiselina i polioksietilensorbitana. To je viskozna, vodotpljiva tekućina jantarne boje. Ester je polioksietilen sorbitana i oleinske kiseline. Molekulska formula mu je  $C_{64}H_{124}O_{26}$ , a molarna masa 1308,83 g/mol ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)). HLB vrijednost iznosi mu 15,0 ([www.pharmlabs.unc.edu](http://www.pharmlabs.unc.edu)).

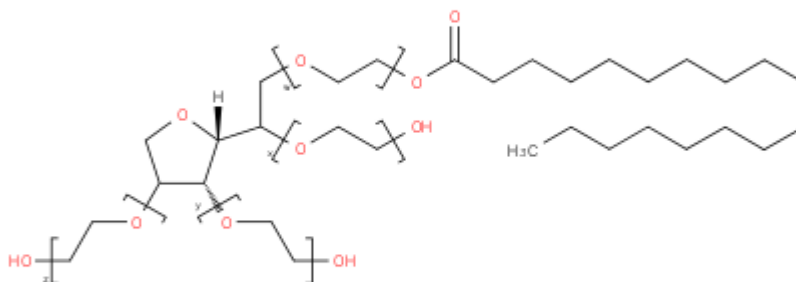
Polisorbati se sintetiziraju od sorbitola u procesu od tri koraka. Najprije se voda eliminira iz sorbitola kako bi se dobio sorbitan (ciklički anhidrid sorbitola). Zatim se sorbitan parcijalno esterificira masnim kiselinama, kao što su oleinska ili stearinska kiselina, da bi se dobio ester sorbitana. Konačno, etilenoksid se adira u prisutstvu katalizatora kako bi se dobio polisorbat (Rowe 2009).



**Slika 8.** Polisorbat 80 (preuzeto s [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)).

#### 1.4.2. Polisorbat 60

Polisorbat 60 ili Tween 60 neionski je emulgator koji pripada skupini parcijalnih estera masnih kiselina i polioksietilensorbitana. Viskozna je, vodotopljiva, blijedo žuta tekućina. Građen je od polioksietilen sorbitana i stearinske kiseline. Molekulska formula mu je  $C_{64}H_{126}O_{26}$ , a molarna masa 1131.9 g/mol ([www.worldofchemicals.com](http://www.worldofchemicals.com)). Njegova HLB vrijednost iznosi 14,9 ([www.pharmlabs.unc.edu](http://www.pharmlabs.unc.edu)). Sintetizira se na način analogan načinu opisanom kod sinteze polisorbata 80.



**Slika 9.** Polisorbat 60 (preuzeto s [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)).

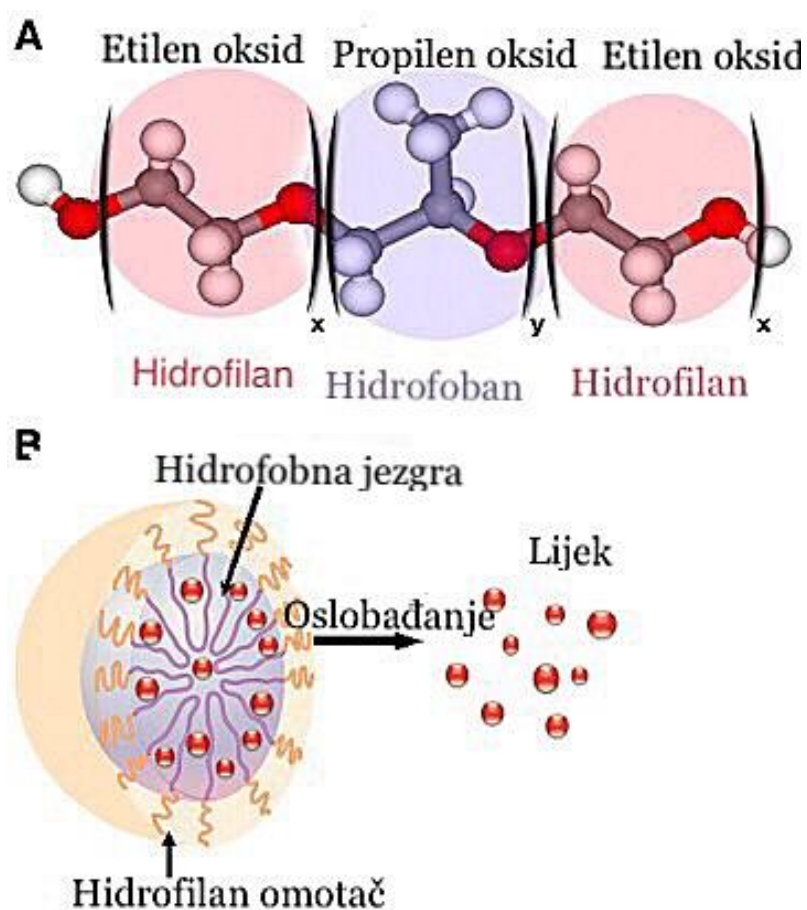
### 1.4.3. Pluronic F68

Kopolimeri koji se sastoje od polietilen oksid – polipropilen oksid – polietilen oksid (PEO–PPO–PEO) blokova komercijalno su dostupni neionski surfaktanti pod imenom Pluronic. Radi se o seriji proizvoda s različitim PO/EO omjerima ili različitim duljinama lanaca dvaju komponenti (Lianwei Jia i sur., 2010). Ti kopolimeri su biokompatibilni, a s povišenjem temperature pokazuju konformacijske promjene i promjene u mikrookolini, u vodenom i/ili organskom otapalu.

Nomenklatura Pluronic surfaktanata može se objasniti na temelju raspona vrijednosti molekulske mase hidrofobnog polipropilen oksida nasuprot masenom udjelu hidrofilnog polietilen oksida. Kombinacije brojeva i slova koriste se za identifikaciju različitih proizvoda iz serije Pluronica. Abecedna oznaka objašnjava fizički oblik proizvoda: „L“ za tekućine, „P“ za paste i „F“ za krutine. Prva znamenka (prve dvije znamenke za troznamenkaste brojeve) brojčane

oznake, pomnožena s 300, ukazuje na približnu molekulsku masu hidrofobnog dijela molekule. Posljednja znamenka, pomnožena s 10, ukazuje na približni sadržaj etilenoksida u molekuli (Liu, ured., 2008).

Pluronic F68 (Kolliphor P188, Poloxamer 188) je bijela krutina. Molekulska masa hidrofobnog dijela molekule je približno 1800 ( $6 \times 300$ ). Hidrofilni dio molekule predstavlja približno 80% ( $8 \times 10$ ) ukupne mase molekule. Njegova HLB vrijednost viša je od 24 (www.sigmaaldrich.com).

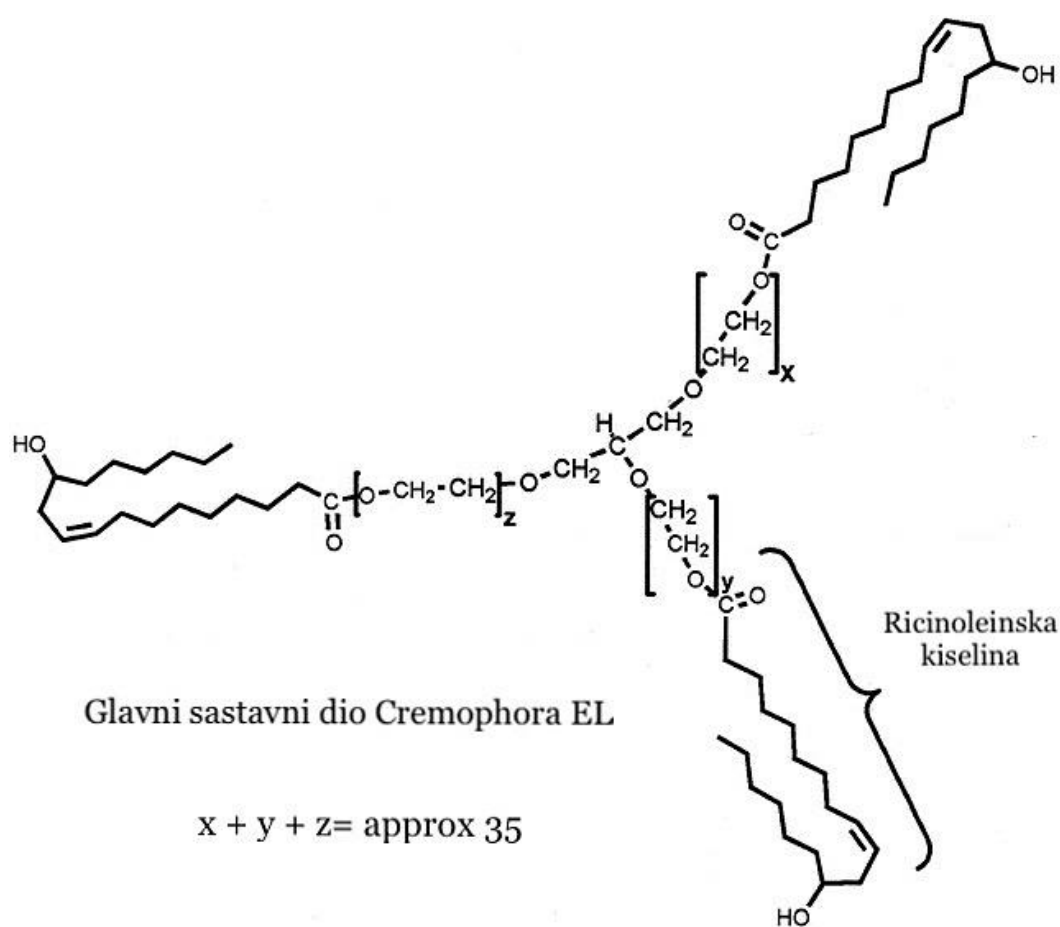


**Slika 10.** Pluronic kopolimer; A – prikaz strukture molekule, B – prikaz micele sa uklopljenim lijekom (preuzeto iz Batrakova i Kabanov, 2008).

#### 1.4.4. Cremophor EL

Cremophor EL (Kolliphor EL) neionski je surfaktant sintetiziran polietoksilacijom ricinusova ulja. Ricinusovo ulje sadrži približno 87% ricinoleinske kiseline,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ . Posljedično, glavna komponenta Cremophora EL je polioksietilen-gliceroltriricinoleat (Baker i Naguib, 2005). U opisanoj reakciji 35 mola etilenoksida reagira s jednim molom ricinusova ulja.

Ovaj surfaktant je transparentna, blijedo žuta, viskozna tekućina. Njegova HLB vrijednost iznosi 14 (Solanki i sur., 2012).



**Slika 11.** Cremophor EL (preuzeto iz Baker i Naguib, 2005).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Osnovni problem konvencionalnih oftalmičkih pripravaka (vodenih otopina i suspenzija) je nedostatna bioraspoloživost uzrokovana brзом i ekstenzivnom eliminacijom iz prekornealnog područja te ograničenom permeabilnošću lijeka kroz fiziološke membrane oka. Osim toga, limitirane su mogućnošću uklapanja jedino u vodi topljivih djelatnih tvari (Lallemant i sur., 2011), a liječenje mnogih oftalmičkih bolesti zahtjeva korištenje lijekova niske topljivosti u vodi. Stoga razvijanje novih formulacija za ovaj način primjene predstavlja veliki izazov. U posljednje vrijeme brojna znanstvena istraživanja usmjerena su na razvoj terapijskih nanosustava za lokalnu oftalmičku primjenu u svrhu produljenja vremena zadržavanja sustava na površini oka, kontroliranja kinetike oslobađanja lijeka i poboljšanja bioraspoloživosti lijeka u oku. Iako su ovi terapijski sustavi opisani u literaturi, nanotehnologija je relativno mlada grana znanosti te je broj razvijenih i komercijalno dostupnih pripravaka koji se na njoj temelje još uvijek prilično malen.

Nanoemulzije su terapijski sustavi čija fizičko-kemijska svojstva, prvenstveno kapljice malih dimenzija, omogućuju napredak u liječenju bolesti oka topikalnom primjenom lijekova. U literaturi je opisan pozitivan učinak na apsorpciju te izrazit potencijal ovih sustava za produljenje vremena zadržavanja lijeka na mjestu primjene, odnosno povećanje bioraspoloživosti lijeka u oku. Sastavnice nanoemulzije se, zbog sličnosti u sastavu, sjedinjuju sa suznim filmom što im omogućuje dulje zadržavanje na površini oka. Osim toga, emulgatori iz nanoemulzija smanjuju kut močenja kod dodira pripravka i površine oka što poboljšava širenje pripravka i vlaženje površine oka. Zabilježena je i izrada nanoemulzija modificiranih kationskim materijalima koje pospješuju dulje zadržavanje vezanjem na negativno nabijenu površinu rožnice (Tamilavan i Benita, 2004; Gan i sur., 2013).

No, jedan od prvih i vrlo važnih koraka u razvoju oftalmičkog terapijskog nanosustava je izbor sirovina koje se odlikuju povoljnim biofarmaceutskim svojstvima te koje će omogućiti izradu terapijskog sustava željenih karakteristika.

U ovom radu pripravljene su četiri varijacije U/V nanoemulzija kao terapijski sustav za topikalnu primjenu lipofilnih oftalmika. Korišteno je ricinusovo ulje kao disperzna faza, a Polisorbat 80, Polisorbat 60, Pluronic F68 i Cremophor EL kao emulgatori. Glavni cilj rada bio je ispitati koji je od spomenutih surfaktanata najprikladniji za izradu nanoemulzija s ricinusovim



uljem. U istraživanju je praćen utjecaj parametara formulacije, i to vrste i koncentracije surfaktanata, na dobivanje nanoemulzija optimalnih svojstava. Pripravljenim nanoemulzijama određena je veličina kapljica, indeks polidisperznosti, zeta–potencijal te stabilnost.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali**

Za izradu nanoemulzija korišteni su ricinusovo ulje (Kemig, Hrvatska), Polisorbat 80 (Kemig, Hrvatska), Polisorbat 60 (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Njemačka), Pluronic F68 (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Njemačka), Cremophor EL (BASF, Njemačka) i pročišćena voda. Pročišćena voda korištena za razrjeđivanje nanoemulzija prije određivanja veličine kapljica i indeksa polidisperznosti propuštena je kroz membranski mikrobakteriološki filter (Spritzen- / Syringe- Filter 0,2 $\mu$ m, TPP, Švicarska). 10mM otopina NaCl (Kemig, Hrvatska) korištena je za razrjeđivanje nanoemulzija prije mjerenja zeta–potencijala te je također propuštena kroz membranski mikrobakteriološki filter (Spritzen- / Syringe- Filter 0,2 $\mu$ m, TPP, Švicarska).

#### **3.2. Metode**

##### **3.2.1. Izrada nanoemulzija**

Izrađeno je dvadeset različitih formulacija U/V nanoemulzija s ricinusovim uljem kao uljnom fazom, pročišćenom vodom kao vodenom fazom te su Polisorbat 80, Polisorbat 60, Pluronic F68 i Cremophor EL korišteni kao surfaktanti. Svi surfaktanti korišteni u ovom ispitivanju su neionski emulgatori koji tvore U/V tip emulzije. Koncentracije svakog surfaktanta bile su 0.5%, 1%, 2.5%, 5% i 10% ukupne mase nanoemulzije, a koncentracija ricinusova ulja 5% ukupne mase nanoemulzije. Ostatak do 100% mase nanoemulzije činila je pročišćena voda. Sastav formulacija prikazan je u Tablici 1.

Uljna i vodena faza pripremljene su odvojeno. Budući da su korišteni surfaktanti hidrofilni, pomiješani su s vodenom fazom te miješani na magnetnoj miješalici do otapanja. Brzina miješanja bila je između 600 i 900 rpm. Kod pripreme formulacija s Polisorbatom 80 u prethodno odvagano ricinusovo ulje dodana je smjesa vode i surfaktanta, dok je kod pripreme ostalih formulacija u smjesu vode i surfaktanta izravno odvagano ricinusovo ulje. Potom su emulzije ponovo miješane na magnetnoj miješalici brzinom između 600 i 900 rpm. Dobivene grube emulzije miješane su na Ultra-Turraxu (ULTRA-TURRAX®, IKA®-Werke GmbH & Co., Staufen, Njemačka) brzinom od 6000 rpm 5 minuta. S ciljem priprave nanoemulzije ovako izrađene preemulzije propuštene su kroz mikrofluidizator (Model M-110EH-30 Microfluidizer, Microfluidics, Newton MA, SAD) 10 puta pri tlaku od 1000 bara. Pripravljene nanoemulzije

premještene su u plastične spremnike (IsoLab, Falcon) ili staklene bočice te su, u njima dobro zatvorene, čuvane u hladnjaku pri  $+4^{\circ}\text{C}$ .



**Slika 12.** Miješanje grubih emulzija na magnetnoj miješalici.

**Tablica 1.** Sastav izrađenih nanoemulzija (maseni udio, %).

Naziv formulacije	Sastavnice (maseni udio, %)				
	Ricinusovo ulje	Polisorbat 80	Polisorbat 60	Pluronic F68	Cremophor EL
P80 0,5	5	0,5	-	-	-
P80 1	5	1	-	-	-
P80 2,5	5	2,5	-	-	-
P80 5	5	5	-	-	-
P80 10	5	10	-	-	-
P60 0,5	5	-	0,5	-	-
P60 1	5	-	1	-	-
P60 2,5	5	-	2,5	-	-
P60 5	5	-	5	-	-
P60 10	5	-	10	-	-
PIF68 0,5	5	-	-	0,5	-
PIF68 1	5	-	-	1	-
PIF68 2,5	5	-	-	2,5	-
PIF68 5	5	-	-	5	-
PIF68 10	5	-	-	10	-
CrEL 0,5	5	-	-	-	0,5
CrEL 1	5	-	-	-	1
CrEL 2,5	5	-	-	-	2,5
CrEL 5	5	-	-	-	5
CrEL 10	5	-	-	-	10

### **3.2.2. Određivanje veličine kapljica i indeksa polidisperznosti**

Prosječna veličina kapljica (eng. *Z-average*, *Z-ave*) i raspodjela veličine kapljica – indeks polidisperznosti (eng. *polydispersity indeks*, PDI) određene su primjenom tehnike dinamičkog raspršenja svjetlosti (eng. *Dynamic Light Scattering*, DLS) tzv. fotonskom korelacijskom spektroskopijom (eng. *Photon Correlation Spectroscopy*, PCS). Korišten je uređaj Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Kapljice ricinusova ulja u nanoemulziji stalno se gibaju (Brownovo gibanje). Ovom tehnikom mjeri se stupanj fluktuacije intenziteta raspršene svjetlosti uzrokovane tim gibanjem. Mjerenje se provodi obasjavanjem uzorka monokromatskom koherentnom laserskom zrakom, te se bilježi intenzitet svjetlosti raspršene na česticama pod određenim kutom. Uređaj je podržan softverom koji analizira ovisnost između kuta raspršenja svjetlosti i veličine kapljica (što je kapljica manja, veći je kut pod kojim se svjetlost raspršuje) i daje raspodjelu veličina kapljica u nanoemulziji.

Indeks polidisperznosti je mjera za raspodjelu veličina čestica i ukazuje na kvalitetu i homogenost disperzije. Ako je PDI jednak 0 (minimalna vrijednost), to označava monodisperznost, a povećanjem iznosa PDI raste širina raspodjele veličine čestica. Vrijednosti PDI blizu 1 (maksimalna vrijednost) pokazuju da je sustav loše kvalitete i nehomogen.

Mjerenja su provedena pri 25 °C, a uzorci su prije mjerenja temperirani na sobnu temperaturu. Uzorci su prije mjerenja razrijeđeni 200 puta, pročišćenom vodom. Mjerenje je provedeno u polistirenskim kivetama za jednokratnu upotrebu.

### **3.2.3. Određivanje zeta–potencijala kapljica nanoemulzija**

Zeta–potencijal, koji karakterizira naboj na površini emulgiranih kapljica ulja, mjereno je uređajem Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Korištena metoda je fotonska korelacijska spektroskopija. Vrijednost zeta-potencijala određuje se indirektno mjerenjem elektroforetske pokretljivosti čestica.

Kada se električno polje primijeni na tekućinu, nabijene čestice u toj tekućini, potaknute privlačnim elektrostatskim silama, kreću se prema elektrodi suprotnog naboja. Sile viskoznosti koje djeluju na čestice nastoje se suprotstaviti tom kretanju. Nakon što se uspostavi ravnoteža između ovih dviju suprotstavljenih sila, čestice se kreću stalnom brzinom. Brzina njihovog

kretanja ovisna je o jakosti električnog polja, dielektričnoj konstanti i viskoznosti disperznog sredstva i zeta–potencijalu (ZETASIZER 2000/3000: Priručnik za uporabu, 2000). Izmjerena elektroforetska pokretljivost kapljica u električnom polju prevedena je u zeta-potencijal primjenom Smoluchowskijeve aproksimacije:

$$U_E = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta}$$

gdje je  $\zeta$  zeta – potencijal,  $U_E$  elektroforetska pokretljivost,  $\eta$  viskoznost disperznog sredstva, a  $\varepsilon$  dielektrična konstanta disperznog sredstva. S obzirom da se nabijene čestice nalaze u promjenjivom električnom polju, one se gibaju i raspršuju svjetlost. Ovisno o brzini gibanja mijenja se i frekvencija svjetlosti. Elektroforetska pokretljivost izračunava se iz spektra frekvencija koje proizlaze iz detektiranih fotona svjetlosti.

Zeta–potencijal nanoemulzija mjeren je nakon odgovarajućeg razrjeđivanja nanoemulzija 10 mM otopinom NaCl. Mjerenja su provedena pri 25 °C.

#### **3.2.4. Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija**

U svrhu ispitivanja stabilnosti nanoemulzija je, 10 dana nakon izrade, ponovno izmjerena veličina kapljica te indeks polidisperznosti i zeta–potencijal.

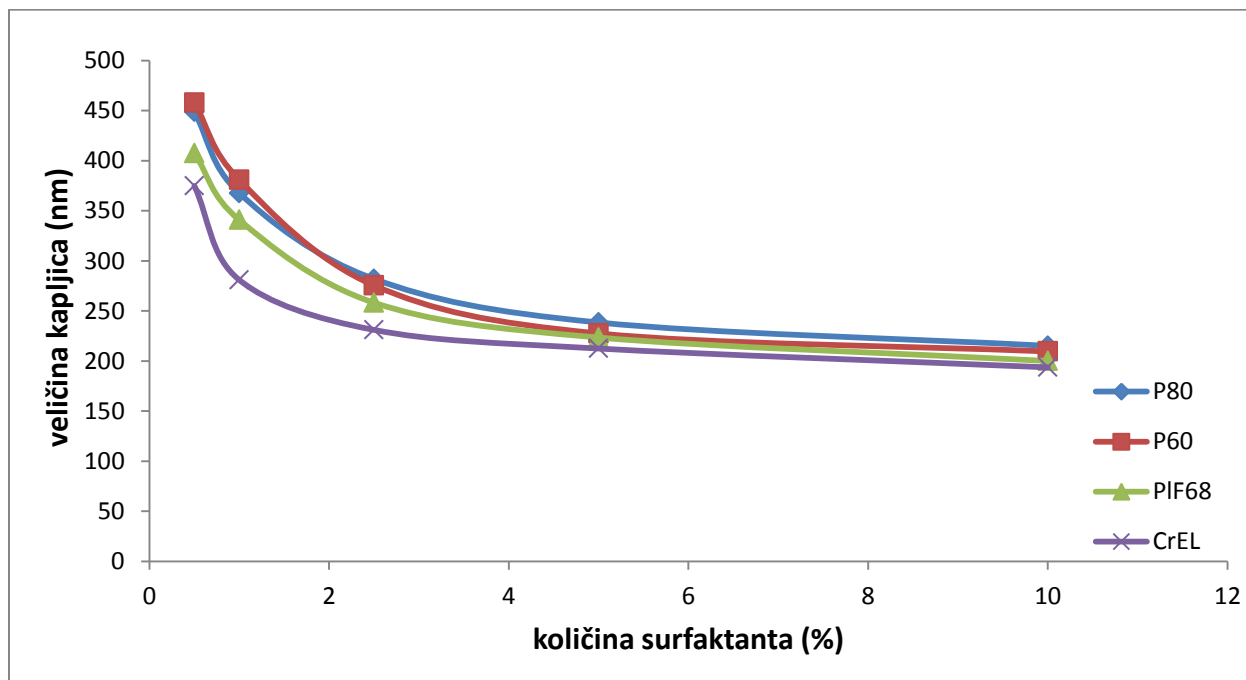
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Izrada nanoemulzija

Nanoemulzije ricinusova ulja s četiri različite vrste surfaktanata uspješno su pripravljene metodom mikrofluidizacije. Prilikom miješanja grubih emulzija na magnetnoj mješalici primijećeno je odvajanje faza kod emulzija s nižim koncentracijama surfaktanta. Nakon miješanja na Ultra Turraxu emulzije su poprimile mliječno bijelu boju. Kod emulzija s nižim koncentracijama surfaktanta primijećeno je vrhjenje 20-30 minuta nakon miješanja na Ultra Turraxu. Nakon propuštanja kroz mikrofluidizator emulzije su bile homogene, mliječno bijele s plavičastim odsjajem, što je i karakteristično za nanoemulzije (Đorđević i sur., 2013). Primijećeno je povećanje bistrine nanoemulzije s porastom koncentracije surfaktanta.

### 4.2. Veličina kapljica

Veličina kapljica ricinusova ulja kao unutarnje faze nanoemulzija izmjerena je na dan izrade te nakon 10 dana od izrade kako bi se ispitala stabilnost. Rezultati su dani u grafičkom prikazu.



**Slika 13.** Ovisnost veličine kapljica ricinusova ulja o količini surfaktanta na dan izrade nanoemulzija.

Korištenjem ricinusova ulja kao uljne faze i navedenih surfaktanata uspješno su izrađene emulzije prosječne veličine kapljica u nanometarskom području. Vidljivo je da prosječna veličina kapljica unutarnje faze pada s porastom koncentracije surfaktanta kao što su pokazali i rezultati iz literature (Gullapalli i Sheth, 1999; Yuan i sur., 2008; Đorđević i sur., 2013; Uluata i sur., 2015). Kod vrlo niskih koncentracija surfaktanata (0.5%, 1%) vrijednosti prosječne veličine kapljica nalaze se izvan područja veličina optimalnih za oftalmičke pripravke (Lallemand i sur, 2011), što dovodi do zaključka da te koncentracije surfaktanata nisu dovoljne za izradu takvih farmaceutskih oblika. Porastom koncentracije (2,5% i više) može se primijetiti pojava platoa kod koncentracije od oko 4% i približne veličine kapljica 250 – 200 nm. Istraživanje Yuan i sur. pokazalo je slične rezultate (Yuan i sur., 2008). Može se zaključiti da daljnjim povećanjem koncentracije bilo kojeg od upotrijebljenih surfaktanata ne bi došlo do značajnijeg smanjenja veličine kapljica. Osim toga, vidljivo je da nanoemulzije izrađene s Cremophorom EL kao surfaktantom imaju nešto manje kapljice u odnosu na one izrađene s ostalim surfaktantima. Moguće objašnjenje ove pojave je već spomenuta kemijska srodnost ovog surfaktanta s ricinusovim uljem. Tan i Nakajima pokazali su da surfaktanti sa većom hidrofilnošću mogu učinkovitije obuhvatiti i stabilizirati kapljice u U/V nanoemulzijama, što za posljedicu ima formiranje manjih kapljica (Tan i Nakajima, 2005). Ovdje to nije slučaj jer Cremophor EL ima manju HLB vrijednost od ostalih korištenih surfaktanata.

#### 4.3. Indeks polidisperznosti

Rezultati određivanja indeksa polidisperznosti opisanih formulacija nanoemulzija, na dan izrade, prikazane su Tablicom 2.

**Tablica 2.** Ovisnost indeksa polidisperznosti (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) o količini surfaktanta u nanoemulziji.

količina surfaktanta (%)	PDI P80	PDI P60	PDI PIF68	PDI CrEL
0,5	0,250 $\pm$ 0,247	0,100 $\pm$ 0,071	0,315 $\pm$ 0,054	0,205 $\pm$ 0,051
1	0,274 $\pm$ 0,069	0,235 $\pm$ 0,075	0,268 $\pm$ 0,058	0,270 $\pm$ 0,038
2,5	0,233 $\pm$ 0,018	0,238 $\pm$ 0,026	0,212 $\pm$ 0,034	0,448 $\pm$ 0,119
5	0,351 $\pm$ 0,069	0,323 $\pm$ 0,048	0,268 $\pm$ 0,021	0,419 $\pm$ 0,006
10	0,396 $\pm$ 0,025	0,426 $\pm$ 0,017	0,313 $\pm$ 0,036	0,431 $\pm$ 0,013



Rezultati mjerenja indeksa polidisperznosti ukazuju da PDI nije ovisan o koncentraciji, niti o vrsti surfaktanta. Dobivene vrijednosti predstavljaju relativno usku raspodjelu veličine kapljica. Međutim, manji broj formulacija pokazuje PDI vrijednosti veće od 0,4. Budući da su nanoemulzije generalno vrlo homogeni sustavi ove vrijednosti PDI smatraju se previsokima (Sadurni i sur., 2005) te postoji mogućnost da su takve vrijednosti posljedica agregacije kapljica unutarnje faze.

#### 4.4. Zeta potencijal

Rezultati određivanja zeta potencijala opisanih formulacija nanoemulzija, na dan izrade, prikazane su Tablicom 3.

**Tablica 3.** Ovisnost zeta – potencijala (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) o količini surfaktanta u nanoemulziji.

količina surfaktanta (%)	zeta–potencijal (mV) P80	zeta–potencijal (mV) P60	zeta–potencijal (mV) PIF68	zeta–potencijal (mV) CrEL
0,5	$-8,6 \pm 0,4$	$-7,5 \pm 0,7$	$-12,2 \pm 0,9$	$-11,2 \pm 0,5$
1	$-3,1 \pm 0,5$	$-5,9 \pm 0,1$	$-9,9 \pm 0,9$	$-8,6 \pm 0,7$
2,5	$-2,5 \pm 0,6$	$-5,5 \pm 0,1$	$-6,0 \pm 0,7$	$-7,2 \pm 0,4$
5	$-2,2 \pm 0,2$	$-5,0 \pm 0,3$	$-5,0 \pm 0,4$	$-6,7 \pm 0,5$
10	$-1,2 \pm 0,3$	$-4,6 \pm 0,8$	$-4,7 \pm 0,5$	$-2,5 \pm 0,5$

Dobiveni rezultati ukazuju da postoji utjecaj količine surfaktanta u nanoemulziji na vrijednost zeta–potencijala. S porastom koncentracije surfaktanta vidljiv je pad apsolutne vrijednosti zeta – potencijala. Same vrijednosti zeta–potencijala negativne su, ali i relativno blizu nuli što ukazuje na postojanje slabog negativnog naboja na površini kapljica unutarnje faze. Budući da su svi korišteni surfaktanti neionski, može se zaključiti da spomenuti naboj potječe od slobodnih masnih kiselina koje su nositelji negativnog naboja. Iako je generalno prihvaćeno da je potrebna apsolutna vrijednost zeta-potencijala viša od 30 mV kako bi disperzija bila stabilna (García-Celma i sur., 2016), u ovom slučaju radi se o steričkoj, a ne elektrostatskoj stabilizaciji te stoga ovakve vrijednosti ne reflektiraju nužno nestabilnost sustava.

#### 4.5. Stabilnost nanoemulzija

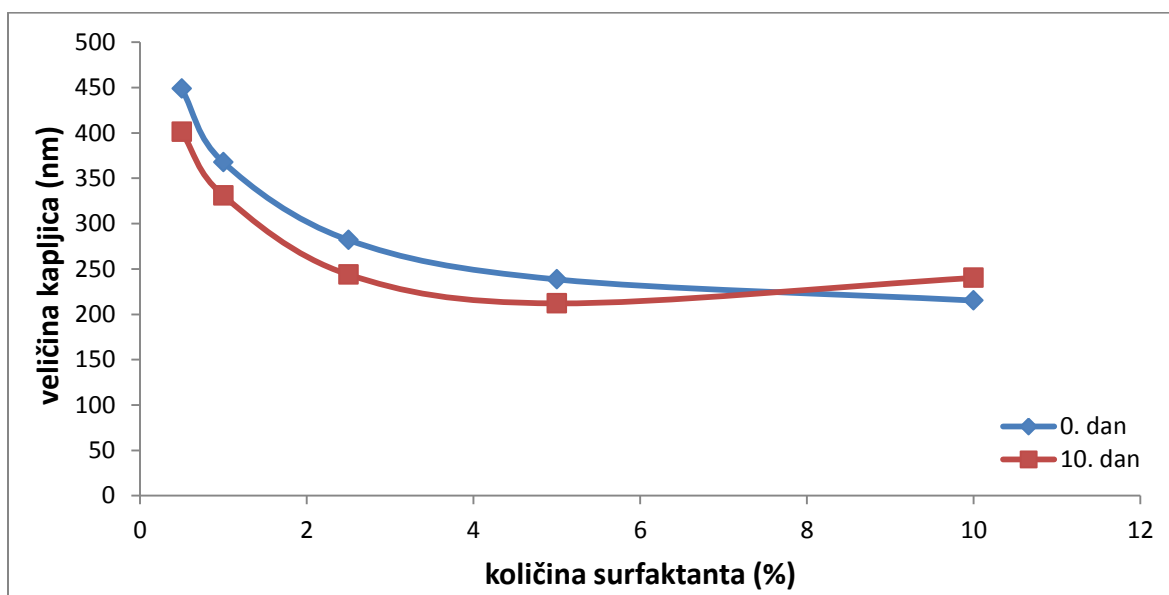
Analiza stabilnosti formulacija tijekom vremena izvršena je usporedbom vrijednosti veličine kapljica, PDI i zeta-potencijala na dan izrade i 10 dana nakon izrade nanoemulzija. Rezultati su prikazani tablicama i grafičkim prikazima.

##### 4.5.1. Stabilnost nanoemulzija s Polisorbatom 80 i Polisorbatom 60 kao surfaktantima

#### Veličina kapljica

**Tablica 4.** Usporedba veličine kapljica ricinusova ulja (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) na dan izrade i 10 dana nakon izrade emulzija s Polisorbatom 80.

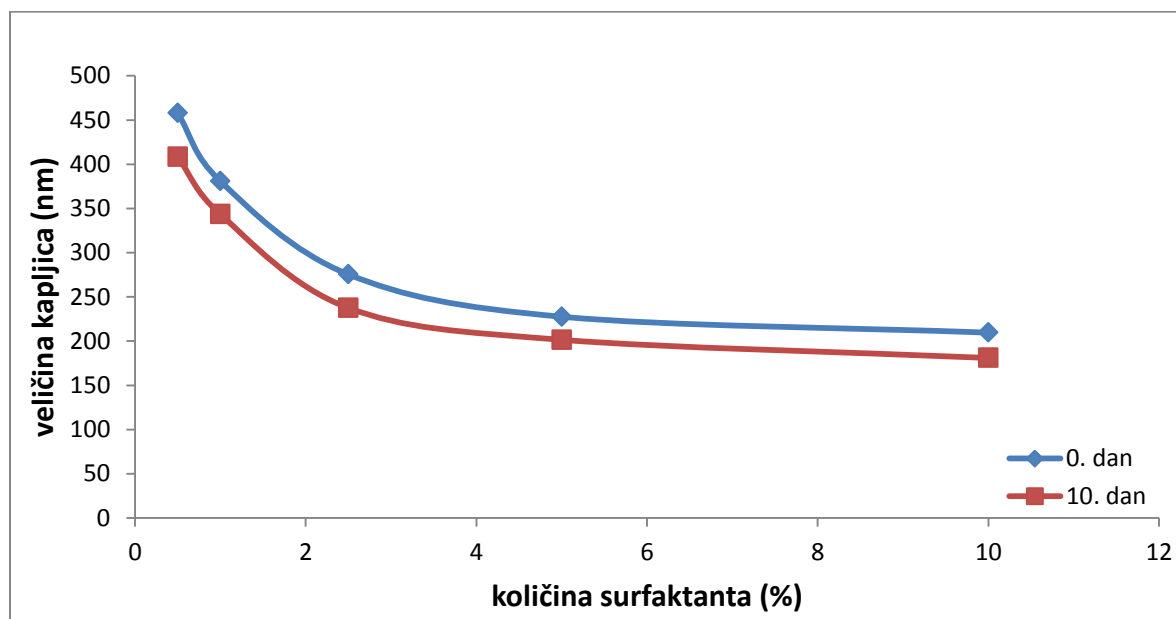
količina P80 (%)	0. dan Z Av (nm)	10. dan Z Av (nm)
0,5	448,7 $\pm$ 11,4	401,2 $\pm$ 4,2
1	367,7 $\pm$ 3,0	331,0 $\pm$ 1,6
2,5	282,0 $\pm$ 3,7	243,9 $\pm$ 3,4
5	238,5 $\pm$ 1,7	212,1 $\pm$ 3,5
10	215,2 $\pm$ 3,5	240,2 $\pm$ 2,3



**Slika 14.** Ovisnost veličine kapljica ricinusova ulja o količini Polisorbata 80 u nanoemulziji.

**Tablica 5.** Usporedba veličine kapljica ricinusova ulja (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) na dan izrade i 10 dana nakon izrade emulzija s Polisorbatom 60.

količina P60 (%)	0. dan Z Av (nm)	10. dan Z Av (nm)
0,5	458,0 $\pm$ 2,8	408,3 $\pm$ 4,0
1	380,9 $\pm$ 4,2	343,5 $\pm$ 3,4
2,5	275,5 $\pm$ 3,0	237,6 $\pm$ 4,3
5	227,6 $\pm$ 4,2	201,5 $\pm$ 1,2
10	209,6 $\pm$ 2,8	181,0 $\pm$ 2,4



**Slika 15.** Ovisnost veličine kapljica ricinusova ulja o količini Polisorbata 60 u nanoemulziji.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se veličina kapljica ricinusova ulja u emulzijama s Polisorbatom 80 i Polisorbatom 60 stajanjem 10 dana smanjila za približno 40 nm. Ovakav rezultat nije u skladu s očekivanjima zbog čega je izražena sumnja da se veličina kapljica smanjuje zbog adsorpcije kapljica ulja na stijenke plastičnog spremnika. Stoga su, prije ponovnog mjerenja nanoemulzije s Pluronicom F68 premještene u 3 različite vrste spremnika kako bi se ispitao utjecaj spremnika u kojem su nanoemulzije čuvane na njihovu stabilnost.

## Polidisperznost

**Tablica 6.** Usporedba indeksa polidisperznosti (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) na dan izrade i 10 dana nakon izrade emulzije s Polisorbatom 80.

količina P80 (%)	0. dan PDI	10. dan PDI
0,5	0,250 $\pm$ 0,247	0,234 $\pm$ 0,185
1	0,274 $\pm$ 0,069	0,222 $\pm$ 0,116
2,5	0,233 $\pm$ 0,018	0,278 $\pm$ 0,026
5	0,351 $\pm$ 0,069	0,305 $\pm$ 0,056
10	0,396 $\pm$ 0,025	0,530 $\pm$ 0,033

**Tablica 7.** Usporedba indeksa polidisperznosti (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) na dan izrade i 10 dana nakon izrade emulzija s Polisorbatom 60.

količina P60 (%)	0. dan PDI	10. dan PDI
0,5	0,100 $\pm$ 0,071	0,287 $\pm$ 0,073
1	0,235 $\pm$ 0,075	0,269 $\pm$ 0,117
2,5	0,238 $\pm$ 0,026	0,298 $\pm$ 0,068
5	0,323 $\pm$ 0,048	0,268 $\pm$ 0,052
10	0,426 $\pm$ 0,017	0,439 $\pm$ 0,143

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se polidisperznost sustava stajanjem ne mijenja značajno, osim u slučaju formulacije "P80 10" gdje je vrijednost PDI porasla do neprihvatljivog iznosa (Sadurni i sur., 2005). Kod P60 formulacija može se primijetiti blagi porast vrijednosti PDI stajanjem (osim za formulaciju "P60 5"). Iako se ove vrijednosti PDI mogu interpretirati kao relativno uska raspodjela veličine kapljica, postoji mogućnost da bi se daljnjim stajanjem te vrijednosti dodatno povećale, što bi značilo i veću vjerojatnost agregacije čestica te bi moglo dovesti stabilnost nanoemulzije u pitanje (Gan i sur., 2013; García-Celma i sur., 2016).

## Zeta–potencijal

**Tablica 8.** Usporedba zeta–potencijala (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) na dan izrade i 10 dana nakon izrade za emulzija s Polisorbatom 80.

količina P80 (%)	0. dan zeta–potencijal (mV)	10. dan zeta–potencijal (mV)
0,5	$-8,6 \pm 0,4$	$-5,7 \pm 0,3$
1	$-3,1 \pm 0,5$	$-3,4 \pm 0,8$
2,5	$-2,5 \pm 0,6$	$-2,7 \pm 0,4$
5	$-2,2 \pm 0,2$	$-2,4 \pm 0,5$
10	$-1,2 \pm 0,3$	$-1,8 \pm 0,5$

**Tablica 9.** Usporedba zeta–potencijala (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) na dan izrade i 10 dana nakon izrade emulzija s Polisorbatom 60.

količina P60 (%)	0. dan zeta–potencijal	10. dan zeta–potencijal
0,5	$-7,5 \pm 0,7$	$-14,1 \pm 0,3$
1	$-5,9 \pm 0,1$	$-13,8 \pm 0,2$
2,5	$-5,5 \pm 0,1$	$-10,9 \pm 0,4$
5	$-5,0 \pm 0,3$	$-10,6 \pm 0,2$
10	$-4,6 \pm 0,8$	$-2,5 \pm 0,4$

Vrijednosti zeta–potencijala na dan izrade i 10 dana nakon izrade ne razlikuju se značajno, odnosno sve vrijednosti su relativno blizu nuli. Takav rezultat je i očekivan. Slabi negativni naboj na površini kapljica unutarnje faze može potjecati od slobodnih masnih kiselina koje su nositelji negativnog naboja.

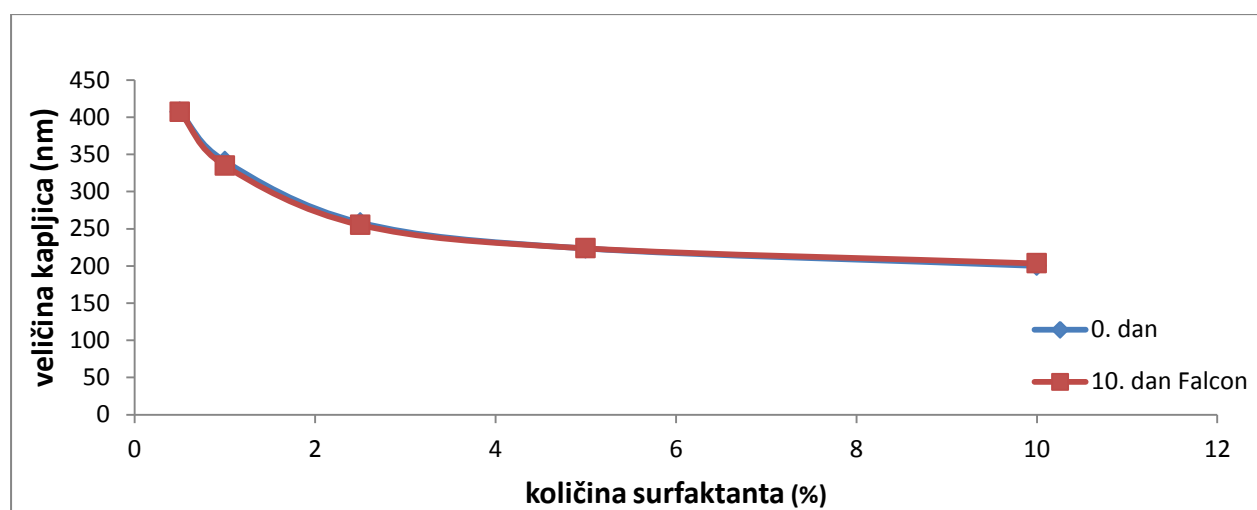
#### 4.5.2. Stabilnost nanoemulzija s Pluronicom F68 kao surfaktantom

Zbog sumnje da je do smanjenja veličine kapljica u nanoemulzijama s P80 i P60 kao surfaktantima došlo zbog adsorpcije kapljica ulja na stijenke plastičnih *IsoLab* spremnika, nanoemulzije s PlF68 kao surfaktantom mjerene su nakon čuvanja u 3 različite vrste spremnika: *IsoLab* plastičnim spremnicima, *Falcon* plastičnim spremnicima te staklenim bočicama. Rezultati su prikazani tablicama i grafičkim prikazima.

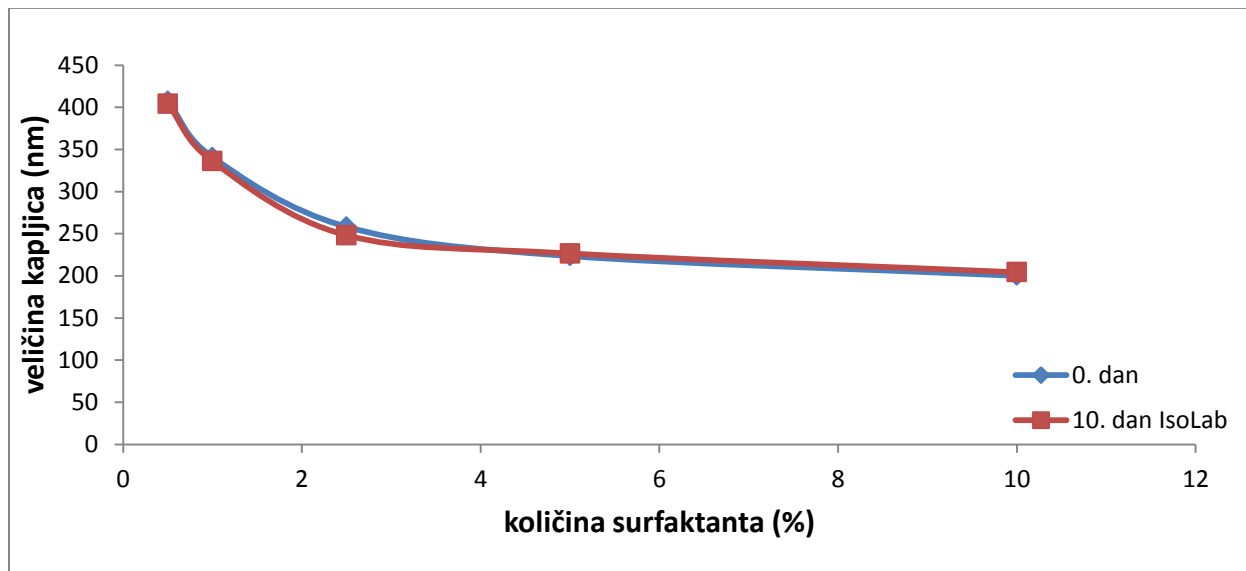
#### Veličina kapljica

**Tablica 10.** Usporedba veličine kapljica ricinusova ulja (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) na dan izrade i 10 dana nakon izrade emulzija s Pluronicom F68 i čuvanja u različitim spremnicima.

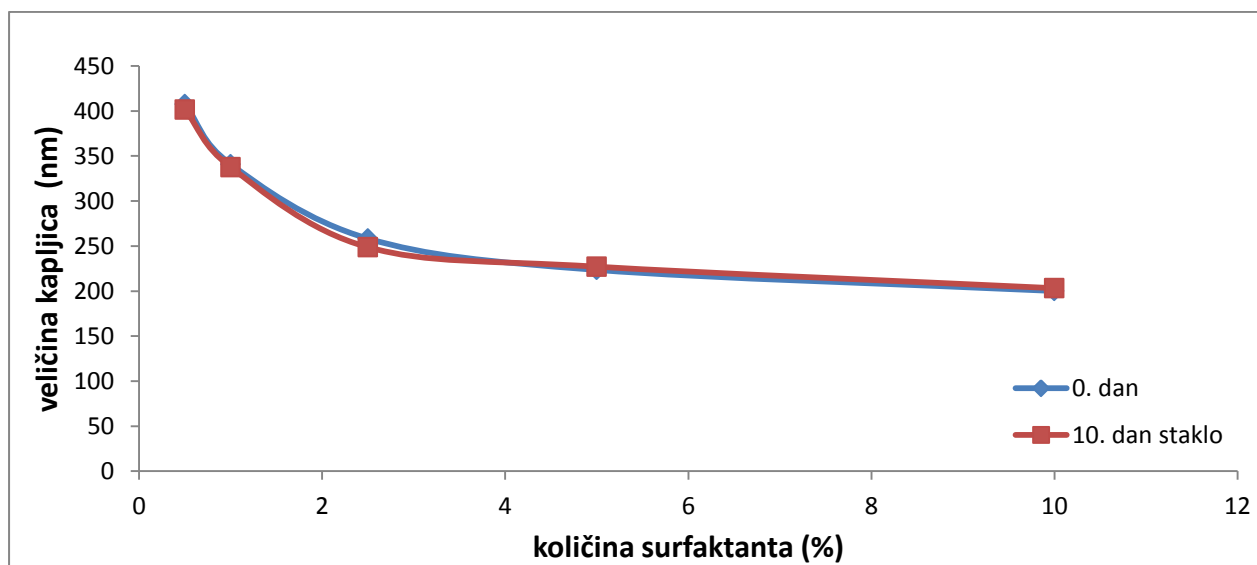
količina Pl F68 (%)	0. dan Z Av (nm)	10. dan (Falcon) Z Av (nm)	10. dan (IsoLab) Z Av (nm)	10. dan (staklena bočica) Z Av (nm)
0,5	407,6 $\pm$ 3,6	407,1 $\pm$ 1,1	404,1 $\pm$ 4,4	401,6 $\pm$ 6,8
1	340,9 $\pm$ 2,2	334,8 $\pm$ 1,6	336,1 $\pm$ 0,9	337,7 $\pm$ 7,0
2,5	258,3 $\pm$ 2,5	255,1 $\pm$ 3,2	248,2 $\pm$ 0,2	248,7 $\pm$ 4,8
5	223,5 $\pm$ 3,9	223,7 $\pm$ 1,9	226,6 $\pm$ 1,5	227,1 $\pm$ 3,2
10	200,1 $\pm$ 2,0	203,4 $\pm$ 1,8	204,3 $\pm$ 2,8	203,2 $\pm$ 2,4



**Slika 16.** Ovisnost veličine kapljica ricinusova ulja o količini Pluronica F68 u nanoemulziji čuvanoj u *Falcon* plastičnom spremniku.



**Slika 17.** Ovisnost veličine kapljica ricinusova ulja o količini Pluronic F68 u nanoemulziji čuvanoj u *IsoLab* plastičnom spremniku.



**Slika 18.** Ovisnost veličine kapljica ricinusova ulja o količini Pluronic F68 u nanoemulziji čuvanoj u staklenoj bočici.

Analizom dobivenih rezultata utvrđeno je da vrsta spremnika u kojima su čuvane nanoemulzije nema utjecaja na veličinu kapljica unutarnje faze. Dobivene vrijednosti prosječne veličine kapljica emulzija iz različitih spremnika ne razlikuju se značajno. Također, nije došlo do agregacije kapljica niti drugih destabilizacijskih procesa što se može zaključiti iz približno jednakih vrijednosti  $Z_{Av}$  izmjerenih na dan izrade i 10 dana nakon izrade.

## Polidisperznost

**Tablica 11.** Usporedba indeksa polidisperznosti (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) na dan izrade i 10 dana nakon izrade emulzija s Pluronicom F68 i čuvanja u različitim spremnicima.

količina Pl F68 (%)	0. dan PDI	10. dan (Falcon) PDI	10. dan (IsoLab) PDI	10. dan (staklena viala) PDI
0,5	$0,315 \pm 0,054$	$0,250 \pm 0,028$	$0,382 \pm 0,021$	$0,330 \pm 0,067$
1	$0,268 \pm 0,058$	$0,325 \pm 0,039$	$0,283 \pm 0,007$	$0,271 \pm 0,060$
2,5	$0,212 \pm 0,034$	$0,337 \pm 0,006$	$0,251 \pm 0,009$	$0,232 \pm 0,076$
5	$0,268 \pm 0,021$	$0,280 \pm 0,007$	$0,287 \pm 0,031$	$0,269 \pm 0,017$
10	$0,313 \pm 0,036$	$0,284 \pm 0,012$	$0,285 \pm 0,010$	$0,220 \pm 0,015$

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se polidisperznost sustava stajanjem ne mijenja značajno. Ove vrijednosti PDI mogu se interpretirati kao relativno uska raspodjela veličine kapljica.



## Zeta – potencijal

**Tablica 12.** Usporedba zeta–potencijala (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) na dan izrade i 10 dana nakon izrade emulzija s Pluronicom F68 i čuvanja u različitim spremnicima.

količina Pl F68 (%)	0. dan zeta–potencijal	10. dan (Falcon) zeta–potencijal	10. dan (IsoLab) zeta–potencijal	10. dan (staklena viala) zeta–potencijal
0,5	$-12,2 \pm 0,9$	$-8,1 \pm 0,2$	$-3,9 \pm 0,6$	$-9,0 \pm 0,6$
1	$-9,9 \pm 0,9$	$-9,6 \pm 0,5$	$-5,2 \pm 0,5$	$-3,7 \pm 0,4$
2,5	$-6,0 \pm 0,7$	$-5,2 \pm 0,6$	$-3,7 \pm 0,5$	$-2,7 \pm 0,4$
5	$-5,0 \pm 0,4$	$-4,0 \pm 0,5$	$-3,5 \pm 0,4$	$-2,5 \pm 0,3$
10	$-4,7 \pm 0,5$	$-3,7 \pm 0,5$	$-2,6 \pm 0,3$	$-1,8 \pm 0,5$

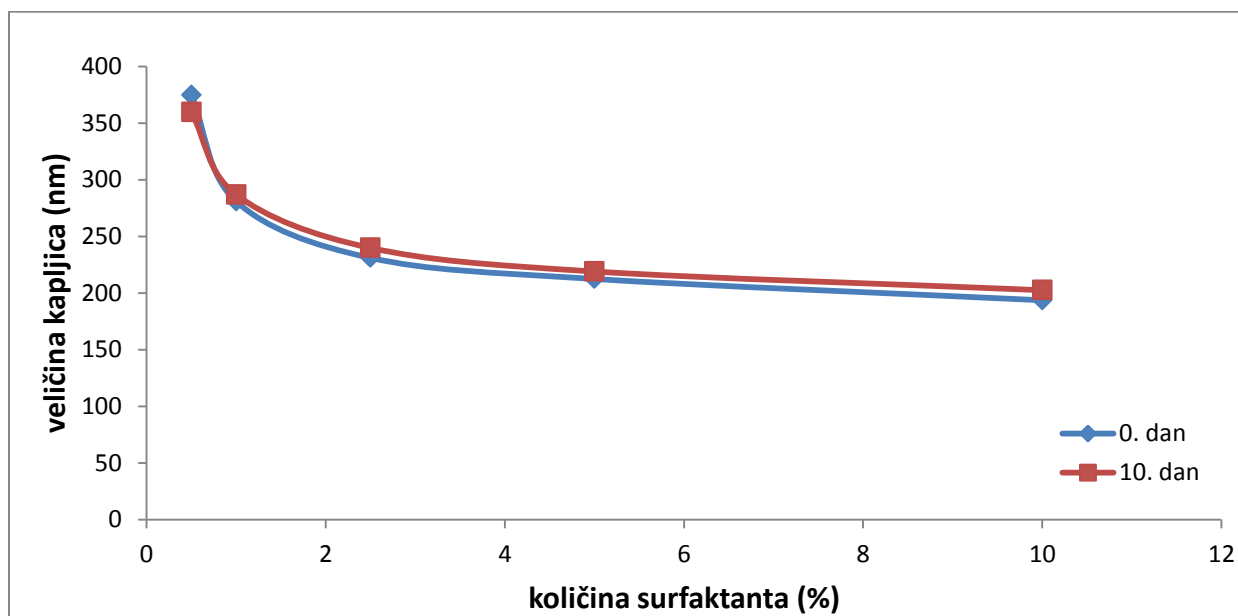
Vrijednosti zeta–potencijala na dan izrade i 10 dana nakon izrade ne razlikuju se značajno, odnosno sve vrijednosti su relativno blizu nuli. Takav rezultat je i očekivan. Slabi negativni naboj na površini kapljica unutarnje faze može potjecati od slobodnih masnih kiselina koje su nositelji negativnog naboja.

#### 4.5.3. Stabilnost nanoemulzija s Cremophorom EL kao surfaktantom

##### Veličina kapljica

**Tablica 13.** Usporedba veličine kapljica ricinusova ulja (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) na dan izrade i 10 dana nakon izrade emulzija s Cremophorom EL.

količina CrEL (%)	0. dan Z Av (nm)	10. dan Z Av (nm)
0,5	$374,8 \pm 1,6$	$359,6 \pm 1,4$
1	$281,0 \pm 2,8$	$286,9 \pm 4,4$
2,5	$231,1 \pm 3,3$	$239,9 \pm 3,7$
5	$212,5 \pm 2,7$	$219,1 \pm 5,1$
10	$193,7 \pm 1,9$	$202,6 \pm 3,9$



**Slika 19.** Ovisnost veličine kapljica ricinusova ulja o količini Cremophora EL u nanoemulziji.

Vrijednosti prosječne veličine kapljica emulzija dobivene na dan izrade i 10 dana nakon izrade ne razlikuju se značajno. Kod nanoemulzija izrađenih s Cremophorom EL kao surfaktantom nije došlo do agregacije kapljica niti drugih destabilizacijskih procesa te se može zaključiti da su ove emulzije stabilne tijekom ispitivanog vremena.

## Polidisperznost

**Tablica 14.** Usporedba indeksa polidisperznosti (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) na dan izrade i 10 dana nakon izrade emulzija s Cremophorom EL.

količina CrEL (%)	0. dan PDI	10. dan PDI
0,5	$0,205 \pm 0,051$	$0,400 \pm 0,071$
1	$0,270 \pm 0,038$	$0,323 \pm 0,067$
2,5	$0,448 \pm 0,119$	$0,316 \pm 0,018$
5	$0,419 \pm 0,006$	$0,348 \pm 0,032$
10	$0,431 \pm 0,013$	$0,397 \pm 0,015$

Dobivene vrijednosti indeksa polidisperznosti ukazuju da dolazi do određenih promjena u sustavu. Iz vrijednosti PDI iznad 0,3 i iznad 0,4 može se zaključiti da raspodjela veličine kapljica nije dovoljno uska (Sadurni i sur., 2005). Budući da su se vrijednosti PDI za emulzije s nižim koncentracijama surfaktanta (0,5% i 1%) stajanjem povećale, a za ostale nanoemulzije su se smanjile, ne možemo govoriti o utjecaju vremena stajanja na širinu raspodjele veličine kapljica.

## Zeta–potencijal

**Tablica 15.** Usporedba zeta–potencijala (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) na dan izrade i 10 dana nakon izrade za emulzija s Cremophorom EL.

količina CrEL (%)	0. dan zeta – potencijal	10. dan zeta – potencijal
0,5	$-11,2 \pm 0,5$	$-13,2 \pm 0,6$
1	$-8,6 \pm 0,7$	$-14,4 \pm 0,4$
2,5	$-7,2 \pm 0,4$	$-9,5 \pm 0,7$
5	$-6,7 \pm 0,5$	$-5,8 \pm 0,5$
10	$-2,5 \pm 0,5$	$-5,3 \pm 0,5$

Vrijednosti zeta–potencijala na dan izrade i 10 dana nakon izrade ne razlikuju se značajno, odnosno sve vrijednosti su relativno blizu nuli. Takav rezultat je i očekivan. Slabi negativni naboj na površini kapljica unutarnje faze može potjecati od slobodnih masnih kiselina koje su nositelji negativnog naboja.

## 5. ZAKLJUČCI

- U/V nanoemulzije ricinusova ulja rastućih koncentracija surfaktanata uspješno su izrađene metodom mikrofluidizacije. U pripravi nanoemulzija korištena su četiri tipa neionskih surfaktanata koji se razlikuju prema kemijskoj strukturi i HLB vrijednostima.
- Vrsta i koncentracija surfaktanta utječe na prosječnu veličinu kapljica ricinusova ulja. Povećanjem koncentracije surfaktanta smanjuje se prosječna veličina kapljica. Polidisperznost sustava neovisna je o vrsti i o koncentraciji surfaktanta.
- Izrađene su nanoemulzije prosječne veličine kapljica od  $193,7 \pm 1,9$  do  $458,0 \pm 2,8$ , uz PDI između  $0,100 \pm 0,071$  i  $0,448 \pm 0,119$  te negativnog zeta – potencijala  $-1,2 \pm 0,3$  do  $-12,2 \pm 0,9$  mV.
- Maseni udjeli surfaktanta od 0,5% i 1% nisu dovoljni za dobivanje nanoemulzija zadovoljavajuće veličine kapljica unutarnje faze. Porastom masenog udjela surfaktanta (2,5% i više) primijećen je "plateau" kod koncentracije od oko 4% i približne veličine kapljica 250 – 200 nm. Daljnjim povećanjem masenog udjela surfaktanta u nanoemulziji ne bi se postigle značajno manje veličine kapljica.
- Od svih ispitivanih kombinacija, najbolju veličinu kapljica pokazala je ona s Cremophorom EL kako surfaktantom, ali se polidisperznost tih sustava pokazala nezadovoljavajućom, odnosno raspodjela veličine kapljica nedovoljno uskom. Najpovoljnije vrijednosti PDI pokazale su nanoemulzije s Pluronicom F68 kao surfaktantom.
- Sve nanoemulzije pokazale su stabilnost tijekom 10 dana, ali nanoemulzijama s Polisorbatom 80 i 60 te s Cremophorom EL kod ponovljenog mjerenja porasla je polidisperznost čestica unutarnje faze što bi moglo učiniti nanoemulzije nestabilnima kroz duže vrijeme.

## 6. LITERATURA

Alany RG, Rades T, Nicoll J, Tucker IG, Davies NM. W/O microemulsions for ocular delivery: evaluation of ocular irritation and precorneal retention. *J Control Release*, 2006, 111, 145–152.

Anton N, Vandamme, TF. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharm Res*, 2011, 28, 978–985.

Aoki S, Mizote H, Minamoto A, Suzuki M, Mishima HK, Tanaka H. Systemic FK506 improved tear secretion in dry eye associated with chronic graft versus host disease. *Br J Ophthalmol*, 2005, 89, 243–244.

Baker MT, Naguib M. Propofol: The Challenges of Formulation, *Anesthesiology* 10, 2005, 103, 860-876.

Batrakova EV, Kabanov AV. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J Control Release*, 2008, 130, 98-106.

Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI), 2017., <http://www.ebi.ac.uk>, pristupljeno 27.2.2017.

Chiappetta DA, Sosnik A. Poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007, 66, 303–317.

Dhas A, Deshmukh G, Andhale V, Patil P, Pansare S, Mundke S. Review on nanoemulsion: a novel drug delivery system, *European J Biomed Pharm Sci*, 2016, 3, 156-166.

Đorđević SM, Cekić ND, Isailović TM, Milić JR, Vuleta GM, Lazić ML, Savić SD. Nanoemulzije dobijene variranjem tipa emulgatora i udela masne faze: Uticaj formulacije i procesnih parametara na karakteristike i fizičku stabilnost. *Hem Ind*, 2013, 67, 795–809.

Ee SL, Duan X, Liew J, Nguyen QD. Droplet size and stability of nano-emulsions produced by the temperature phase inversion method. *Chem Eng J*, 2008, 140, 626–631.

Gan L, Wang J, Jiang M, Bartlett H, Ouyang D, Eperjesi F, Liu j, Gan Y. Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. *Drug Discov Today*, 2013, 18, 290-297.

García-Celma MJ, Homs M, Morales D, Solans C. Nanocolloids – A Meeting Point for Scientists and Technologists. U: CHAPTER 11 Nano-emulsions for Pharmaceutical Applications. Sanchez-Dominguez M, Rodriguez-Abreu C, urednici, Elsevier Inc., 2016, 365-388.

Gullapalli RP, Sheth BB. Influence of an optimized non-ionic emulsifier blend on properties of oil-in-water emulsions. *Eur J Pharm Biopharm*, 1999, 48, 233-238.

Gupta A, Burak H, Hatton TA, Doyle PS. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, 2016, 12, 2826-2841.

Hörmann K, Zimmer A. Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions - A review. *J Control Release*, 2016, 223, 85-98.

Jaiswal M, Dudhe R, Sharma PK. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech*, 2015, 5, 123–127.

Jia L, Guoa C, Yanga L, Xiangb J, Tangb Y, Liua C, Liu H. Mechanism of PEO–PPO–PEO micellization in aqueous solutions studied by two-dimensional correlation FTIR spectroscopy. *J Colloid Interface Sci*, 2010, 345, 332–337.

Lallemand F, Daull P, Benita S, Buggage R, Garrigue JS. Successfully Improving Ocular Drug Delivery Using the Cationic Nanoemulsion, Novasorb. *J Drug Deliv*, 2012, 10, 1-16.

Liu R. Water-Insoluble Drug Formulation, Second Edition. Boca Raton, FL, CRC Press, 2008, str. 309-310.

Mason TG, Wilking JN, Meleson K, Chang CB, Graves SM. Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties. *J Phys Condens Matter*, 2006, 18, 635-666.

Model M-110EH-30 Microfluidizer® Processor: User Manual. USA, Microfluidics, 2012, str. 2.1-2.2.

Pepić I. Novi sustavi za primjenu lijeka u oko. *Farm Glas*, 2004, 60, 523-539.

Pepić I. Problemi lokalne primjene pripravka za oči. *Farm Glas*, 2004, 60, 311-329.

Reimondez-Troitiño S, Csaba N, Alonso MJ, De la Fuente M. Nanotherapies for the treatment of ocular diseases. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 95, 279-293.

Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of Pharmaceutical Excipients. London, Pharmaceutical Press, 2009, str. 551.

Sadurni N, Solans C, Azemar N, Garcia-Celma MJ. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Sci*, 2005, 26, 438-445.

Senjković R. Osnove oblikovanja lijekova. Zagreb, Školska knjiga, 2003, str. 88.

Sharma N, Mishra S, Sharma S, Deshpande RD, Sharma RK. Preparation and Optimization of Nanoemulsions for targeting Drug Delivery. *Int J Drug Dev Res*, 2013, 5, 37-48.



Solanki SS, Sarkar B, Dhanwani RK. Microemulsion drug delivery system: for bioavailability enhancement of ampelopsin. *ISRN Pharm*, 2012, 1-4.

Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ. Nano-emulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2005, 30, 102-110.

Sugumar S, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Nanoemulsion formation and characterization by spontaneous emulsification: Investigation of its antibacterial effects on *Listeria monocytogenes*. *Asian J Pharm*, 2015, 9, 23-28.

Surfactants Classified by HLB Numbers | Sigma-Aldrich, 2017., <http://www.sigmaaldrich.com>, pristupljeno 27.2.2017.

Tadros TF. Emulsion Formation, Stability, and Rheology; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2013, str. 48-57.

Tamilvanan S, Benita S. The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 58, 357-368.

Tan CP, Nakajima M,  $\beta$ -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation, *Food Chem*, 2005, 92, 661-671.

The Pharmaceutics and Compounding Laboratory, 2017., <http://www.pharmlabs.unc.edu>, pristupljeno 27.2.2017.

Uluata S, Decker EA, McClements DJ. Optimization of Nanoemulsion Fabrication Using Microfluidization: Role of Surfactant Concentration on Formation and Stability, *Food Biophys*, 2015, 1, 52-59.

Understanding Emulsion Eye Drop Technology, 2003., <https://www.reviewofoptometry.com>, pristupljeno 15.5.2017.

World of Chemicals – online chemical directory, chemistry portal, articles, news, 2017., <http://www.worldofchemicals.com>, pristupljeno 27.2.2017.

Yuan Y, Gao Y, Zhao J, Mao L. Characterization and stability evaluation of  $\beta$ -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions, *Food Res Int*, 2008, 41, 61-68.

ZETASIZER 2000/3000: Zeta potential measurements; Manual number MAN0150. UK, Malvern Instruments Ltd., 2000, str. 1.2-1.3.

## 7. SAŽETAK / SUMMARY

Najveći nedostatak konvencionalnih oftalmičkih farmaceutskih oblika njihova je slaba bioraspoloživost, a koja je posljedica barijera prednjeg dijela oka. Nanoemulzije su sustavi s kapljicama nanometarskih dimenzija, a koje imaju izraženi potencijal za uspješnije savladavanje spomenutih barijera.

Cilj ovog ispitivanja bio je da se metodom mikrofluidizacije izrade U/V nanoemulzije ricinusova ulja stabilizirane različitim vrstama neionskih surfaktanata. U tu svrhu određivani su prosječna veličina kapljica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal nanoemulzija. Rezultati su pokazali da se povećanjem količine surfaktanta veličina kapljica unutarnje faze nanoemulzije smanjuje. Količine surfaktanata od 0,5% i 1% ukupne mase emulzije pokazale su se nedovoljnima za dobivanje sustava zadovoljavajućih svojstava. Porastom masenog udjela surfaktanta (2,5% i više) primijećen je plato kod koncentracije od oko 4% i približne veličine kapljica 250 – 200 nm. Daljnjim povećanjem masenog udjela surfaktanta u nanoemulziji ne bi se postigle značajno manje veličine kapljica. Najmanju prosječnu veličinu čestica pokazale su nanoemulzije kod kojih je kao surfaktant korišten Cremophor EL. Najmanje vrijednosti indeksa polidisperznosti pokazale su nanoemulzije kod kojih je kao surfaktant korišten Pluronic F68. Ispitivanje zeta-potencijala svih formulacija ukazuje na postojanje slabog negativnog naboja na površini kapljica unutarnje faze koji potječe od slobodnih masnih kiselina porijeklom iz ricinusova ulja. Sve nanoemulzije pokazale su stabilnost tijekom 10 dana, ali nanoemulzijama s Polisorbati 80 i 60 te s Cremophorom EL kod ponovljenog mjerenja porasla je polidisperznost čestica unutarnje faze što bi moglo učiniti nanoemulzije nestabilnima kroz duže vrijeme.

The biggest disadvantage of conventional ophtalmic formulations lies in their low bioavailability which is restricted due to the ocular barriers in the anterior parts of the eye. Nanoemulsions are a drug delivery system characterized by the droplets with a droplet size in the nanometer range and with the great potential to overcome these barriers.

The goal of this research was to prepare O/W type nanoemulsions containing castor oil and four types of non-ionic surfactants using the microfluidization method. The average droplet size, polydispersity index as well as the zeta-potential of nanoemulsions were determined. The results obtained suggested the increase in surfactant quantity causes a decrease in internal phase droplet size. Surfactant quantities of 0,5% and 1% (of total emulsion mass) showed to be insufficient for preparing nanoemulsions of adequate properties. With growth of the surfactant mass percentage, a plateau was noticed at a concentration of around 4% and droplet sizes of approximately 250 – 200 nm. Further growth of surfactant mass percentage would not result in ensuring significantly smaller droplet sizes. Nanoemulsions containing Cremophor EL as a surfactant proved to have droplets of the smallest average size. The smallest polydispersity index (PDI) values were observed in nanoemulsions containing Pluronic F68 as a surfactant. Zeta-potential measurements of all formulations indicate the existence of low negative charge at the surface of internal phase droplets. This charge originates from free fatty acids that come from castor oil. All of the nanoemulsions were shown to be stable for 10 days, but there was an increase in PDI values noticed after remeasuring the properties of nanoemulsions containing Polysorbate 80, Polysorbate 60 and Cremophor EL. Polydispersity of these formulations could result in nanoemulsion destabilisation over a longer period of time.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmaceutsku tehnologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Razvoj oftalmičkih nanoemulzija ricinusovog ulja stabiliziranih neionskim surfaktantima

Matea Krpan

#### SAŽETAK

Najveći nedostatak konvencionalnih oftalmičkih farmaceutskih oblika njihova je slaba bioraspoloživost, a koja je posljedica barijera prednjeg dijela oka. Nanoemulzije su sustavi s kapljicama nanometarskih dimenzija, a koje imaju izraženi potencijal za uspješnije savladavanje spomenutih barijera.

Cilj ovog ispitivanja bio je da se metodom mikrofluidizacije izrade U/V nanoemulzije ricinusova ulja stabilizirane različitim vrstama neionskih surfaktanata. U tu svrhu određivani su prosječna veličina kapljica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal nanoemulzija. Rezultati su pokazali da se povećanjem količine surfaktanta veličina kapljica unutarnje faze nanoemulzije smanjuje. Količine surfaktanata od 0,5% i 1% ukupne mase emulzije pokazale su se nedovoljnim za dobivanje sustava zadovoljavajućih svojstava. Porastom masenog udjela surfaktanta (2,5% i više) primijećen je plato kod koncentracije od oko 4% i približne veličine kapljica 250 – 200 nm. Daljnjim povećanjem masenog udjela surfaktanta u nanoemulziji ne bi se postigle značajno manje veličine kapljica. Najmanju prosječnu veličinu čestica pokazale su nanoemulzije kod kojih je kao surfaktant korišten Cremophor EL. Najmanje vrijednosti indeksa polidisperznosti pokazale su nanoemulzije kod kojih je kao surfaktant korišten Pluronic F68. Ispitivanje zeta-potencijala svih formulacija ukazuje na postojanje slabog negativnog naboja na površini kapljica unutarnje faze koji potječe od slobodnih masnih kiselina porijeklom iz ricinusova ulja. Sve nanoemulzije pokazale su stabilnost tijekom 10 dana, ali nanoemulzijama s Polisorbata 80 i 60 te s Cremophorom EL kod ponovljenog mjerenja porasla je polidisperznost čestica unutarnje faze što bi moglo učiniti nanoemulzije nestabilnima kroz duže vrijeme.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 48 stranica, 19 grafičkih prikaza, 15 tablica i 41 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Nanoemulzije, metoda mikrofluidizacije, oftalmička primjena, ricinusovo ulje, Polisorbat 80, Polisorbat 60, Pluronic F68, Cremophor EL

Mentor: **Dr. sc. Jasmina Lovrić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Jasmina Lovrić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Anita Hafner**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2017.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutics  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Development of ophthalmic castor oil nanoemulsions stabilized by non-ionic surfactants

Matea Krpan

#### SUMMARY

The biggest disadvantage of conventional ophthalmic formulations lies in their low bioavailability which is restricted due to the ocular barriers in the anterior parts of the eye. Nanoemulsions are a drug delivery system characterized by the droplets with a droplet size in the nanometer range and with the great potential to overcome these barriers. The goal of this research was to prepare O/W type nanoemulsions containing castor oil and four types of non-ionic surfactants using the microfluidization method. The average droplet size, polydispersity index as well as the zeta-potential of nanoemulsions were determined. The results obtained suggested the increase in surfactant quantity causes a decrease in internal phase droplet size. Surfactant quantities of 0,5% and 1% (of total emulsion mass) showed to be insufficient for preparing nanoemulsions of adequate properties. With growth of the surfactant mass percentage, a plateau was noticed at a concentration of around 4% and droplet sizes of approximately 250 – 200 nm. Further growth of surfactant mass percentage would not result in ensuring significantly smaller droplet sizes. Nanoemulsions containing Cremophor EL as a surfactant proved to have droplets of the smallest average size. The smallest polydispersity index (PDI) values were observed in nanoemulsions containing Pluronic F68 as a surfactant. Zeta-potential measurements of all formulations indicate the existence of low negative charge at the surface of internal phase droplets. This charge originates from free fatty acids that come from castor oil. All of the nanoemulsions were shown to be stable for 10 days, but there was an increase in PDI values noticed after remeasuring the properties of nanoemulsions containing Polysorbate 80, Polysorbate 60 and Cremophor EL. Polydispersity of these formulations could result in nanoemulsion destabilisation over a longer period of time.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 48 pages, 19 figures, 15 tables and 41 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Nanoemulsions, microfluidization method, ophthalmic application, castor oil, Polysorbate 80, Polysorbate 60, Pluronic F68, Cremophor EL

Mentor: **Jasmina Lovrić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Jasmina Lovrić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Anita Hafner, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2017.

